

Aus dem Veterinär-Pathologischen Institut
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. E. Weiss

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur
Reifung von Viren der Klassischen Geflügelpest (KP)
in Monolayer-Kulturen embryonaler Hühnerzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Manfred Reinacher
Tierarzt aus Gelnhausen

Gießen 1974

Aus dem Veterinär-Pathologischen Institut
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. E. Weiss

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur
Reifung von Viren der Klassischen Geflügelpest (KP)
in Monolayer-Kulturen embryonaler Hühnerzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
bei dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Manfred Reinacher
Tierarzt aus Gelnhausen

Gießen 1974

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
in Gießen

Dekan: Professor Dr. M. Frimmer

Berichterstatter: Professor Dr. E. Weiss

Tag der mündlichen Prüfung: 6.8.1974



Diese Arbeit ist im Sonderforschungsbereich 47
(Virologie, Gießen) entstanden und wurde auf
seine Veranlassung unter Verwendung der ihm von
der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung
gestellten Mittel durchgeführt.

III

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	2
1. Ultrastruktur des "Chick Embryo Cell (CEC) "-Monolayers	2
2. Ultrastruktur der Influenzaviren	5
3. Ultrastruktur der Influenzavirus- vermehrung	7
a. Virusaufnahme	7
b. Virusreplikation und -ausschleusung	8
4. Einfluß von Concanavalin A (Con A) auf den CEC-Monolayer vor und nach der Infektion mit KP-Virus	11
5. Kontrastierung mit Rutheniumrot (RR)	12
III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	14
A. Material und Methode	14
1. Gewebekultur	14
2. Infektion der Kulturen	14
3. Inkubation mit Concanavalin A	15

IV

	Seite
4. Gewinnung und Präparation der Zellen für die Elektronenmikroskopie	13
a. Pelletmethode	16
b. Rutheniumrotkontrastierung	17
c. Präparation der Monolayer für die elektronenmikroskopische Untersuchung in situ	18
d. Nachkontrastierung der Dünnschnitte	19
5. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	19
B. Ergebnisse der eigenen Untersuchungen	19
1. Ultrastruktur nichtinfizierter CEC-Monolayer	19
2. Ultrastruktur der Vermehrung des KP-Virus im CEC-Monolayer	23
a. Virusaufnahme	23
b. Virusreplikation und -ausschleusung	24
3. Ultrastruktur mit KP-Virus infizierter CEC-Monolayer nach Rutheniumrotkontrastierung	27
4. Ultrastruktur mit KP-Virus infizierter und mit Concanavalin A inkubierter CEC-Monolayer	28

	Seite
IV. DISKUSSION	29
1. Ultrastruktur nichtinfizierter CEC-Monolayer	29
2. Ultrastruktur der Vermehrung des KP-Virus im CEC-Monolayer	29
a. Virusaufnahme	29
b. Virusreplikation und -ausschleusung	31
3. Einfluß von Concanavalin A	36
V. ZUSAMMENFASSUNG	39
VI. ABBILDUNGEN	43
VII. LITERATURVERZEICHNIS	65
Lebenslauf	

I. EINLEITUNG

Die Reifung von Influenzaviren erfolgt nach allgemein gültiger Ansicht bei der Ausschleusung aus der Zellmembran. Einige wenige Autoren berichten jedoch auch über eine gelegentlich zu beobachtende Maturation in zytoplasmatischen Vakuolen. I. STERZ (1972) aus unserer Arbeitsgruppe fand in Hühnerthrombozyten nur eine intrazytoplasmatische Reifung des KP-Virus.

Angeregt durch ihre Befunde wurde die Aufgabe gestellt, die Verhältnisse an embryonalen Hühnerzellen (CEC), die das geeignete Zellsystem für die Vermehrung des KP-Virus darstellen, elektronenmikroskopisch zu überprüfen. Die Untersuchungen sollten primär zeigen, in welcher Art und Häufigkeit eine intrazytoplasmatische Virusreifung auftritt. Sie sollten weiterhin klären, ob es sich bei den virushaltigen zytoplasmatischen Vakuolen um echte Vakuolen oder lediglich um quergeschnittene Einstülpungen der äußeren Zellmembran handelt. Diese Fragestellung bestand auch bei den Versuchen mit Concanavalin A (Con A), das die Ausschleusung des KP-Virus aus der Zellmembran verhindern und das Auftreten virushaltiger Vakuolen begünstigen soll (ROTT, BECHT, HAMMER, KLENK und SCHOLTISSEK, 1974).

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Ultrastruktur des "Chick Embryo Cell (CEC)"-Monolayers

Unter "Chick Embryo Cells" werden hier sowohl die in der Literatur so bezeichneten Kulturen als auch die dort "Chick Embryo Fibroblasts" genannten zusammengefaßt. Sie bestehen zum weit überwiegenden Teil, jedoch nicht ausschließlich, aus Fibroblasten. In der Literatur werden nur die für diese Kulturen typischen, fibroblastenartigen Zellen beschrieben. Unter Fibroblasten versteht man Zellen, die die Potenz haben, Kollagen und Grundsubstanz zu bilden, oder die beides produzieren.

HEINE, LANGLOIS, RIMAN und BEARD (1969) sahen große morphologische Unterschiede zwischen verschiedenen Zellen innerhalb einer CEC-Kultur. Die Zellen sind entweder ausbreitet und polygonal oder spindelförmig. Der Kern ist ovoid oder spindelig mit zwei bis drei dichten, abgerundeten Nukleoli, das Zytoplasma schaumig und in einigen Zellen auch vakuolig.

Nach DI STEFANO und DOUGHERTY (1965) sind die CEC lang, schlank und spindelförmig, tragen keine Zytoplasmafortsätze und haben ein helles Zytoplasma mit hellen Vakuolen. Das Kernmaterial ist feingranulär und homogen verteilt. Die Ribosomen liegen sowohl frei als auch membrangebunden vor. Die Mitochondrienzahl ist relativ gering, der Golgiapparat mittelgroß, aber gut strukturiert.

ABERCOMBIE, HEAYSMAN und PEGRUM (1971) geben anhand von Vertikalschnitten durch Kulturen an, daß die Zellen 2-4 μ m dick und 20-80 μ m lang sind. An der Zellunterseite befinden sich doppelt so häufig wie an der Zelloberseite 150-250 nm breite, "coated" Membraneinstülpungen.

Das rauhe endoplasmatische Retikulum (RER) verläuft oft auf lange Strecken parallel zur äußeren Zellmembran. Ebenso verhält sich ein unter der äußeren Zellmembran hinziehendes Filamentbündel, das sich unter der Zelloberseite häufiger findet als an der Zellunterseite. Gleichartige Filamentbündel, deren Filamente einen Durchmesser von 7-9 nm haben, beschreibt auch PERDUE (1973).

Die Zellunterseite ist selten mehr als 100 nm von der Unterlage entfernt und heftet sich mit etwa 10-100 Haftpunkten von je ca. $1-2/\mu\text{m}^2$ an ihr fest (ABERCOMBIE, HEAYSMAN und PEGRUM, 1971).

Kollagenbildung im CEC-Monolayer beobachteten YARDLEY, HEATON, GAINES und SHULMAN (1960). Sie geben die Maße für die Periodizität der Querstreifung mit 59,5-64 nm an. YARDLEY und BROWN (1965) fanden in CEC-Kulturen ein zwischen den Zellen liegendes "broad band material" mit einer durchschnittlichen Periodizität von 85 nm (75-95 nm) und einer aus Längsfibrillen bestehenden Unterstruktur. Dieses "broad band material" bindet kolloidales Eisen.

BROCK und HAY (1971) stellten morphologische Unterschiede zwischen jungen und alten CEC fest. In jungen Zellen sind die Mitochondrien oval und haben quer verlaufende Cristae. Der Kern ist fast oval und das Chromatin bis auf kleine Aggregate am Kernrand und im Kerninneren diffus verteilt. Dagegen sind die Kerne alter Zellen auffällig lobuliert, haben keine Chromatinaggregate an der Kernmembran und sind zum Teil in der Schnittebene mehrfach unterbrochen. Die Mitochondrien tragen längs verlaufende Cristae, sind oft U-förmig gebogen, besitzen quer verlaufende Einziehungen oder sind bizarr geformt. In über 90 % der alten Zellen sind sekundäre Lysosomen und "residual bodies" zu finden. In etwa 20 % der Zellen, die insgesamt abgerundeter erscheinen als

die jungen Zellen, werden Lipidtropfen beobachtet. Dagegen konnten die Autoren keine morphologischen Anzeichen für eine Veränderung der Syntheseaktivität während der Zellalterung erkennen, d.h., sie sahen keine Unterschiede im stark entwickelten RER und Golgiapparat.

Morphologische Unterschiede zwischen Primärkulturen und Zellen aus mehrfachen Subkulturen beschreiben COURINGTON und VOGT (1967). Die Zellen aus Primärkulturen sind ausgestreckt und schlank. Der Kern liegt zentral und besitzt nur wenig aggregiertes Chromatin, das hauptsächlich am Kernrand und in geringem Maße um den Nukleolus angeordnet ist. Die Nukleolusgröße variiert stark. Es sind nur wenige, runde Mitochondrien vorhanden. Das RER ist spärlich ausgebildet und zeigt enge Lumina. Freie Ribosomen sind in mittlerer Zahl und oft zu Haufen zusammengelagert zu finden, Glykogen und Lipidtropfen sind selten. Fibrillen und Mikrotubuli sind am Zellrand konzentriert und verlaufen in etwa parallel zur Zelllängsachse. Dagegen tritt nach mehrfacher Subkultivierung der Nukleolus stärker hervor. Die Mitochondrien sind oft länger und zum Teil sogar verzweigt. Das RER zeigt zisternenartige Erweiterungen. Vakuolen, Lysosomen und Fibrillen nehmen an Zahl zu, Fibrillen und Mikrotubuli verlaufen auffälliger parallel zur Zelllängsachse.

Von einer kristalloiden Anordnung nicht membrangebundener Ribosomen in etwa 2 % der kultivierten CEC berichten MARALDI, BIAGINI, SIMONI, BARBIERI, MARINI und BERSANI (1973).

2. Ultrastruktur der Influenzaviren

Im folgenden werden unter Influenzaviren nur die Influenza A- und B-Viren verstanden.

Prinzipielle strukturelle Unterschiede zwischen den verschiedenen Influenzaviren sind nicht bekannt. Daher erscheint es gerechtfertigt, die bekannte Morphologie der Influenzaviren auch als repräsentativ für das KP-Virus anzusehen.

Die Influenzaviren bestehen aus einem helikalen Nukleokapsid, das auch als Ribonukleoproteid (RNP)-Antigen bezeichnet wird. Dieses wird von einer Außenhülle (Envelope) umgeben, die aus Proteinen, Lipiden und Kohlenhydraten aufgebaut ist. Die Außenhülle stellt eine virus-spezifisch veränderte Plasmamembran dar, die an ihrer Peripherie stachelartige Fortsätze (Spikes) trägt und an ihrer Innenfläche durch das sogenannte Membran (M)-Protein ausgekleidet ist. Die Spikes sind Glykoproteide, die Träger des Virushämagglutinins und der Neuraminidase sind. Der zentrale, das RNP-Antigen enthaltende Teil des Viruspartikels wird als Core bezeichnet (Literaturübersicht bei WHITE, 1974).

Das RNP-Antigen stellt sich elektronenmikroskopisch als elektronendichte Granula im Core der Viruspartikel dar (COMPANS, DIMMOCK und MEIER-EWERT, 1970). APOSTOLOV und FLEWETT (1965) konnten in einigen Viruspartikeln durch Negativkontrastierung eine helikale Innenstruktur sichtbar machen.

Eine schematische Darstellung eines Influenzaviruspartikels gibt die Abb. 1 wieder (nach NERMUT, 1972).

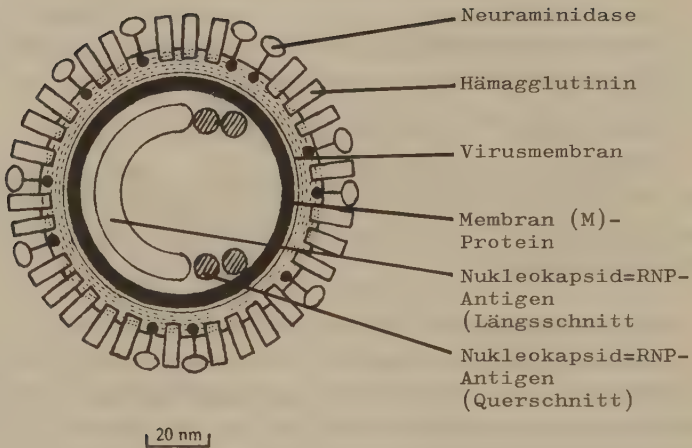


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Influenzaviruspartikels (nach NERMUT, 1972)

Für die einzelnen Virusbestandteile gibt NERMUT (1972) folgende Maße an:

- Viruspartikel: 110 nm Durchmesser
- Core: 73 nm Durchmesser
- Nukleokapsid: 8 nm Durchmesser
- Hämagglutinin: 5 x 14 nm, 10 nm aus der Virusmembran herausragend
- Neuraminidase: 16 nm lang, 11 nm aus der Virusmembran herausragend, großer Durchmesser der äußeren Verdickung 8 nm, Durchmesser des inneren Knopfes 4 nm

Abstand der

Spikesmittelpunkte: 7,5 nm

Virusmembrandicke: 7,5 nm

Elektronenoptisch besitzen Suspensionen infektiöser Influenzaviruspartikel einen hohen Prozentsatz an sphärischen Viruspartikeln einheitlicher Größe mit dichten, zentralen Granula. Daneben sind mehr oder weniger häufig pleomorphe oder filamentöse Virusstrukturen zu sehen, die oft die zentralen Granula nicht aufweisen. Ganz besonders häufig treten diese sogenannten inkompletten Formen nach Applikation hoher Infektionsmultiplizitäten auf (SCHÄFER, ZILLIG und MUNK, 1954; WATERSON, ROTT und SCHÄFER, 1961; MOORE, DAVIES, LEVINE und ENGLERT, 1962). Es ist jedoch zu beachten, daß die inkompletten Viruspartikel keine Vorstufen zu infektiösen Viruspartikeln darstellen (MORGAN, HSU und ROSE, 1962).

3. Ultrastruktur der Influenzavirusvermehrung

a. Virusaufnahme

Schon nach 5 Minuten ist im Elektronenmikroskop eine Anlagerung der Viruspartikel an die Zelloberfläche zu sehen (HOYLE, 1962; BLASKOVIC, RHODES, DOANE und LABZOFFSKY, 1972; BOSSART, MEYER und BIENZ, 1973). Sie erfolgt auch in der Kälte (4°C), jedoch tritt dann keine Penetration in das Zytoplasma, bei der die Viruspartikel ihre Außenhülle verlieren, auf (MORGAN und ROSE, 1968; FRAENKEL-CONRAD, 1974).

Nach DALES (1973) konnte bisher keine einhellige Meinung erreicht werden, ob das genetische Material der Influenzaviren über eine Fusion mit der äußeren Zellmembran oder durch die Viropexis (FAZEKAS DE ST. GROTH, 1948), d.h. über eine Phagozytose, in die Zelle gelangt.

In verschiedenen Influenzavirus-Zellsystemen fanden einige Autoren (CHOPPIN und DALES, 1962; BÄCHI, 1970;

STERZ, 1972; BOSSART, MEYER und BIENZ, 1973) eine Viro-
pexis und zum Teil einen strukturellen Abbau der phago-
zytierten Viruspartikel (CHOPPIN und DALES, 1962; BÄCHI,
1970). Dagegen konnten MORGAN und ROSE (1968) neben einer
Fusion von Viruspartikeln mit der Zelloberfläche auch de-
ren Phagozytose beobachten, sie vertreten jedoch die An-
sicht, daß die phagozytierten Viruspartikel nicht zur
Infektion der Zellen beitragen. Eine dritte Gruppe von
Autoren (HOYLE, 1962; BLASKOVIC, RHODES, DOANE und
LABZOFFSKY, 1972) beschreibt nur eine Fusion der Virus-
partikel mit der Zelloberfläche.

KATO und EGGERS (1969) geben an, daß fast alle adsor-
bierten KP-Viren innerhalb einer Stunde ihr genetisches
Material freigesetzt haben.

b. Virusreplikation und -ausschleusung

FRANKLIN und HENRY (1960) beobachteten eine Ausschleu-
sung neugebildeter KP-Viren aus CEC ab der 2. Stunde p.i.
Nach ihren Angaben wird neues Virus dann nur bis zur 8.
Stunde p.i. synthetisiert und bis zur 24. Stunde p.i.
freigesetzt. Die Autoren fanden keine Hinweise auf eine
eventuelle Readsorption freigesetzter Viren durch die
Zellen.

Nach CIAMPOR und TURCAN (1972), die die Vermehrung des
KP-Virus im CEC-Monolayer elektronenmikroskopisch unter-
suchten, bilden sich 4 Stunden p.i. fibrilläre Strukturen
von 10-11 nm Durchmesser im Kern, die nach Unterbrechung
der Kontinuität der Kernmembran in das Zytoplasma gelan-
gen. Einige dieser Filamente zeigen eine Aufspaltung in
zwei feinere, 5 bis 5,5 nm dicke Fibrillen. Ebenfalls
nach vier Stunden erscheinen im Kern elektronendichte
Körperchen, die anfangs in einem Kernteil akkumuliert

sind, sich später (8 Stunden p.i.) jedoch diffuser im Kern verteilen. Acht Stunden p.i. tritt eine Ausschleusung neugebildeter Viruspartikel (Knospung = "budding") an der Zelloberfläche auf, in deren Nähe einzelne oder in asteroiden Strukturen angeordnete Filamente von 10-11 nm Durchmesser zu sehen sind. Aus diesen Strukturen lösen sich einzelne Fibrillen und wandern zum Core knospender Viruspartikel.

LAUFENBERG (1973) berichtet, daß innerhalb der ersten vier Stunden nach der Infektion gelegentlich einige KP-Viruspartikel an der Zellmembran von CEC und innerhalb membranumschlossener Vakuolen zu beobachten sind. Er fand viruspezifische Veränderungen nur an der äußeren Zellmembran. Diese dokumentieren sich ab 5 Stunden p.i. zuerst in einer stärkeren Osmiophilie der Plasmamembran, die sich dann im Bereich der osmiophilen Regionen kugel- oder schlauchförmig ausstülpt. Die Größe dieser Ausstülpungen ist verschieden, ihre Breite entspricht in etwa dem Durchmesser der Viruspartikel. Diese Protrusionen, die nicht nur rechtwinklig zur Oberfläche, sondern auch flach aus der Zelle herausragen, zerfallen ab 11 Stunden p.i. gelegentlich in einzelne Viruspartikel, setzen oft jedoch nur ein einziges Viruspartikel frei. Intakte Viruspartikel, die zum Teil in Aggregaten vorliegen, sind in diesem Infektionsstadium an der Zellperipherie zu finden.

STERZ (1972) stellte fest, daß in Hühnerthrombozyten neugebildete KP-Viruspartikel nur in optisch leeren und in autophagischen Vakuolen auftreten. Ihre Befunde weisen auch auf ein "budding" an der äußeren Kernmembran hin. Das Auftreten neugebildeter Influenzaviruspartikel in Vakuolen der Chorionallantoismembran neben der normalen Knospung an der Zelloberfläche beschreiben MORGAN,

HSU, RIFKIND, KNOX und ROSE (1961 a). Sie konnten zeigen, daß die Viruspartikel in solchen Vakuolen nicht mit Ferritin-konjugierten Antikörpern zu beladen waren. COMPANS und DIMMOCK (1969) fanden ebenfalls als zusätzliche Lokalisation neugebildete Influenzaviruspartikel in Vakuolen von CEC, jedoch war in allen virushaltigen Vakuolen, nachdem 30 Minuten lang kolloidales Thorium im Kulturmedium zugesetzt war, Thorium zu sehen. Daraus schlossen sie, daß alle virushaltigen Vakuolen von der äußeren Zellmembran abstammen. Auch ein "budding" in diese Vakuolen konnte von den Autoren beobachtet werden. COMPANS (1973) nimmt an, daß die Lumina eines Teiles der Vakuolen zum Zeitpunkt der Fixation nicht mehr in Verbindung mit dem extrazellulären Raum standen. Dieselben Schlüsse wie COMPANS und DIMMOCK (1969) zogen ANISIMOVA, TUCKOVA und VONKA (1973) aufgrund ultrastruktureller Untersuchungen von BHK 21-Zellen nach der Infektion mit einem Influenzavirus.

In Kern und Zytoplasma verschiedener, mit Influenzaviren infizierter Zellsysteme wurden fibrilläre, tubuläre und fleckige Strukturen gefunden, die in entsprechenden nichtinfizierten Zellen nicht nachzuweisen waren (MORGAN, HSU, RIFKIND, KNOX und ROSE, 1961 b; KOPP, KEMPF und KROEGER, 1968; COMPANS und DIMMOCK, 1969; APOSTOLOV, FLEWETT und KENDAL, 1970; ARCHETTI, BERECKZY, ROSATI-VALENTE und STEVE-BOCCIARELLI, 1970; SAITO, YOSHIOKA, IGARASHI und NAKAGAURA, 1970; CIAMPOR, 1972; CIAMPOR und TURCAN, 1972; ANISIMOVA, TUCKOVA und VONKA, 1973). Diese Strukturen sind sehr komplex, und ihr Auftreten und Aussehen ist von dem Verhältnis zwischen Virus und Zellsystem abhängig (KOPP, KEMPF und KROEGER, 1968; SAITO, YOSHIOKA, IGARASHI und NAKAGAURA, 1970; CIAMPOR und TURCAN, 1972). Da die im KP-CEC-System bekannten Veränderungen oben schon beschrieben wurden, wird hier nicht mehr weiter auf die erwähnten fibrillären, tubulären und fleckigen Strukturen in anderen

Influenzavirus-Zellsystemen eingegangen. Soweit sie für die eigenen Befunde relevant sind, werden sie in der Diskussion ausführlicher besprochen.

Mit KP-Virus infizierte CEC zeigen lichtmikroskopisch zuerst eine stärkere Granulierung des Zytoplasmas, dann eine Abrundung der Zellen (PEREIRA und GOMPELS, 1954), lösen sich von der Unterlage ab (ALLISON und MALLUCCI, 1965) und sind nach 24 Stunden fast völlig zerstört (ROTT, BECHT, KLENK und SCHOLTISSEK, 1972).

4. Einfluß von Concanavalin A (Con A) auf den CEC-Monolayer vor und nach der Infektion mit KP-Virus

Von Con A ist schon lange bekannt, daß es virustransformierte Zellen zu agglutinieren vermag. Es agglutiniert auch CEC, die mit Influenzaviren infiziert sind. Andererseits sind nach Con A-Behandlung keine virusspezifischen Aktivitäten im Medium Influenzavirus-infizierter Kulturen feststellbar, obwohl die Virusbestandteile in den infizierten CEC gebildet werden. Somit ist eine Veränderung der Zelloberfläche unter Con A-Einwirkung anzunehmen, die einen Einfluß auf den Vermehrungszyklus von Influenzaviren hat.

Ab 2 Stunden nach der Infektion mit dem KP-Virus sind die Zellen, wenn sie resuspendiert werden, durch Con A agglutinierbar. Es ist nicht nötig, daß die Virusuntereinheiten zu kompletten Viruspartikeln zusammengebaut werden, um eine Agglutinierbarkeit zu erreichen (BECHT, ROTT und KLENK, 1971), jedoch müssen in der Zelle Komponenten der Virushülle synthetisiert werden (BECHT, ROTT und KLENK, 1972).

Nach ROTT, BECHT, HAMMER, KLENK und SCHOLTISSEK (1974) treten knospende Viruspartikel an der Zelloberfläche infizierter und mit Con A behandelter Zellen sehr selten auf, liegen jedoch häufig in intrazellulären Vakuolen und knospen auch in diese.

Nach Con A-Einwirkung sind im Medium infizierter Kulturen keinerlei virusspezifische Aktivitäten feststellbar. Dies trifft auch zu, wenn Con A dem Kulturmedium nur vor der Infektion zugesetzt wurde. Con A wird auch an uninfizierte Zellen gebunden. Es wird postuliert, daß nach der Reaktion zwischen Con A und Zellrezeptor eine Gitterbildung an der Zelloberfläche auftritt, die die Membranflexibilität herabsetzt. Gleichzeitig soll die Zellmembran durchlässiger werden (ROTT, BECHT, KLENK und SCHOLTISSEK, 1972). Freie KP-Viren werden auch von Con A agglutiniert (BECHT, ROTT und KLENK, 1972; KLENK, ROTT und BECHT, 1972).

5. Kontrastierung mit Rutheniumrot (RR)

Die spezifische Darstellung der Zelloberfläche (Glykokalix) mit RR ermöglicht es, im Elektronenmikroskop zwischen quergeschnittenen, von der Zellmembran ausgehenden Invaginationen und echten Vakuolen zu unterscheiden.

Rutheniumrot verbindet sich selektiv mit den sauren Mukopolysacchariden der Glykokalix, so daß diese sehr elektronendicht erscheint. Die übrigen Zellmembranen weisen nur einen schwachen, osmiumbedingten Kontrast auf, falls nicht mit Uranylazetat und Bleizitrat nachbehandelt wird.

Eine Ausnahme von dieser Regel konnte nur in wenigen

Zellarten für bestimmte Zellorganellen festgestellt werden. Bei nicht mehr intakter Zellmembran werden auch Zytoplasma- und Kernbestandteile mit Rutheniumrot beladen (LUFT, 1971).

Auch in Fibroblastenkulturen wird an intakten Zellen nur die Glykokalix mit RR kontrastiert (MARTINEZ-PALAMO und BRAILOVSKY, 1968; MORGAN, 1968; MARTINEZ-PALAMO, 1970; CIAMPOR, 1972). Die Glykokalix von CEC ist auf einer Zelle in Dicke und Dichte unterschiedlich und wird von Hyaluronidase, nicht aber von Neuraminidase und Trypsin abgebaut (MORGAN, 1968).

Nach der Infektion mit Influenzaviren soll keine RR-Kontrastierung der Zelloberfläche im Bereich knospender Viruspartikel stattfinden. Sonst lassen sich keine Unterschiede im Verhalten Influenzavirus-infizierter CEC gegenüber RR feststellen (CIAMPOR, 1972).

Kollagenfasern sind in RR-positives Material eingehüllt (LUFT, 1971).

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Material und Methode

1. Gewebekultur

Die Zellsuspension primärer CEC, hergestellt nach der von KRAUS und SCHÄFER (1963) angegebenen Methode, wurde vom Virologischen Institut des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus Liebig-Universität Gießen bezogen.

Als Kulturmedien wurden verwendet:

- a. Eagle's MEM + 10 % fetales Kälberserum
- b. Lavit + 10 % fetales Kälberserum
- c. McCoy + 24 % fetales Kälberserum

Die Aussaatdichte betrug $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml. Es wurden 15 ml der Zellsuspension in 75 cm²-Plastikflaschen (C.A. Greiner und Söhne, Nürtingen) pipettiert, die Flaschen mit einem Luft/CO₂ (95/5 %)-Gemisch begast und im Brutschrank (37° C) inkubiert.

2. Infektion der Kulturen

20 bis 40 Stunden nach der Aussaat, wenn der Monolayer geschlossen war, wurde das Medium entfernt, dreimal mit PBS gewaschen und dann die KP-Virussuspension (Stamm "Rostock"; 2^{-10} Hämagglutinationseinheiten/ml Eiflüssigkeit) in 10 ml PBS in die Flasche pipettiert (10 PBE/Zelle). Nach 30 Minuten Bebrütung wurden die Kulturen erneut dreimal mit PBS gewaschen, mit 15 ml Medium aufgefüllt, begast und in den Brutschrank gebracht (Nullzeit).

Zur Untersuchung des Eindringens der Viren in die

Zellen wurde mit 100 und 350 PBE/Zelle infiziert. Diese Kulturen wurden nach 10, 15, 20 und 30 Minuten Bebrütung geerntet (Kurzzeitversuch).

3. Inkubation mit Concanavalin A

Die für die Infektion vorgesehenen Kulturen wurden im Virologischen Institut des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus Liebig-Universität Gießen in Plastikpetrischalen von 5 cm Durchmesser (C.A. Greiner & Söhne, Nürtingen) angesetzt. Sie wuchsen in Eagle's MEM bei 5 % CO₂ in der Atmosphäre. Diese Kulturen wurden mit 10 PBE/Zelle infiziert. Das zur Nullzeit zugesetzte Medium eines Teiles der Kulturen enthielt 50 µg Con A (Calbiochem, San Diego) pro ml. Der andere Teil dieser Kulturen diente zur Kontrolle des Infektionszyklus ohne Con A-Einwirkung. Zur Kontrolle der Con A-Wirkung auf die nichtinfizierten CEC wurden diese wie oben beschrieben in Flaschen gezüchtet, dreimal mit PBS gewaschen, eine halbe Stunde in PBS im Brutschrank gehalten und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden in jede Flasche 15 ml Eagle's MEM mit 50 µg Con A/ml Medium gegeben und die Zellen wieder bebrütet. Alle Kulturen wurden 9 Stunden p.i. geerntet.

4. Gewinnung und Präparation der Zellen für die Elektronenmikroskopie

Die infizierten Kulturen wurden 10, 20 und 30 Minuten p.i., stündlich von der ersten bis zur zwölften Stunde und 24, 30 und 48 Stunden p.i. geerntet. Nichtinfizierte Kontrollkulturen wurden bis zu 10 Tagen gehalten und in täglichem Abstand gewonnen und untersucht.

a. Pelletmethode

Die Monolayer wurden außer in den Kurzzeitversuchen entweder mit PBS oder mit Medium dreimal gewaschen und dann die Flaschen mit ca. 10 ml der Waschflüssigkeit aufgefüllt. Danach wurde ein Teil der Kulturen mit einem halbierten Silikonstopfen abgeschabt und bei 3000 UpM 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zentrifugenröhrchen etwa zur Hälfte mit Fixierungsgemisch (5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,2) gefüllt. Nach einer Stunde wurde der Pellet gelöst, in kleine Blöckchen von weniger als 1 mm Kantenlänge zerschnitten und eine Stunde im gleichen Fixierungsgemisch nachfixiert. Danach kamen die Blöckchen in Waschlösung (0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,2 mit 7,524 g Saccharose/100 ml).

Der andere Teil der Kulturen wurde in der Flasche als Monolayer fixiert. Dazu wurden entweder nach dem Waschen 5 ml der Waschflüssigkeit in die Flasche pipettiert und die gleiche Menge Fixierungsgemisch zugegeben, oder die Kulturflaschen wurden nach dem Waschen nur mit Fixierungsgemisch gefüllt. Die Fixierungsdauer betrug in allen Fällen eine Stunde. Der Monolayer wurde darauf im Fixativ abgeschabt, 10 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert und der Pellet wie oben weiterbehandelt.

Die im Kurzzeitversuch verwendeten Kulturen wurden insofern anders behandelt, als sie vor der Fixation in der Flasche beziehungsweise vor dem Abschaben nicht gewaschen wurden. Das Medium wurde soweit abgegossen, daß dieselbe Flüssigkeitsmenge in der Flasche blieb, wie sie bei den übrigen Kulturen nach dem Waschen in der Flasche war. Dann wurde entsprechend den oben beschriebenen Methoden weiterbehandelt.

Die Pellets wurden in mehrfach gewechselter Waschlösung im Kühlschrank aufbewahrt. Sie wurden vor der Einbettung in Durcupan^R eine Stunde in 1 % Osmiumtetroxid (in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,2) nachfixiert und in Azeton entwässert.

b. Rutheniumrotkontrastierung

Die Monolayer wurden gewaschen, in Medium abgeschabt und bei 3000 UpM 5 Minuten lang zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und der Pellet nach LUFT (1971) mit RR kontrastiert. Dazu wurde zuerst mit der Lösung A überschichtet.

Lösung A: 3,6 % Glutaraldehyd in Aq.dest.	1 Teil
0,2 M Cacodylatpuffer (pH 7,3)	1 Teil
RR-Stammlösung	1 Teil

Nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde dreimal 3 Minuten mit 0,15 M Cacodylatpuffer gewaschen, ehe mit Lösung B überschichtet wurde.

Lösung B: 5 % Osmiumtetroxid in Aq.dest.	1 Teil
0,2 M Cacodylatpuffer (pH 7,3)	1 Teil
RR-Stammlösung	1 Teil

Nach drei Stunden bei Zimmertemperatur wurde dreimal kurz mit 0,15 M Cacodylatpuffer (pH 7,3) gewaschen, der Pellet gelöst, zerschnitten (unter 1 mm Kantenlänge) und bis zur Entwässerung und Einbettung in Waschlösung im Kühlschrank aufgehoben.

Herstellung der RR-Stammlösung: Je 50 mg Rutheniumrot wurden mit einigen Tropfen destilliertem Wasser im Mörser fein zerrieben und dann mit soviel Aq.dest. in ein Zentrifugenröhrchen gespült, daß dieses bis zur 15 ml-Marke gefüllt war. Die Röhrchen wurden danach 10 Minuten in einem 60° C warmen Wasserbad geschüttelt und darauf

10 Minuten bei 20° C zentrifugiert (1500 g). Der Überstand wurde abgesaugt und eingefroren.

c. Präparation der Monolayer für die elektronenmikroskopische Untersuchung in situ

Die Zellen wurden wie oben beschrieben in der Flasche fixiert und danach Waschlösung in die Flasche gegeben. Zur Nachfixierung wurde 1 % Osmiumtetroxid (in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,2) eine Stunde in die Flasche gegeben und dann der Monolayer in der Äthanolreihe entwässert. Die verschiedenen Mischungen von Durcupan^R wurden der Reihe nach in die Flasche gefüllt. War das endgültige Gemisch in der Flasche, wurde diese 2 Stunden in den Brutschrank (50° C) gebracht, anschließend das Kunststoffgemisch möglichst weitgehend aus der Flasche abgegossen und diese wieder zur endgültigen Polymerisation in den Brutschrank gestellt. Nach der Aushärtung des Einbettungsmittels in der Flasche wurden 24 Stunden im Brutschrank (50° C) vorgehärtete, mit dem endgültigen Kunststoffgemisch gefüllte Gelatine kapseln auf die Außenseite des Flaschenbodens gestülpt und im Brutschrank fertiggehärtet.

Die Kapseln wurden samt dem anhaftenden Flaschenbodenteil, auf dem innen der eingebettete Monolayer sitzt, mit einem glühenden Skalpell ausgeschnitten, getrimmt und dann Ultradünnschnitte von der ehemaligen Flaschenbodeninnenseite aus parallel zum Monolayer durch die der Unterlage noch anhaftenden Zellen mit dem Ultramikrotom (Reichert OM U3) angefertigt.

d. Nachkontrastierung der Dünnschnitte

Die auf Formvar^R-befilmten Netzen aufgebrauchten Dünnschnitte wurden je 10 Minuten mit 2 %igem Uranylazetat und 0,1 %igem Bleizitrat, das entsprechend den Angaben von VENABLE und COGGESHALL (1965) hergestellt wurde, nachkontrastiert.

5. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgten mit einem Siemens Elmiskop 101 bei einer Röhrenspannung von 80 kV.

Als Filmmaterial wurde Agfa Scientia 23 D 56 verwendet. Es wurde in einer aus 10 Teilen Aq.dest. und 1 Teil Eukobrom bestehenden Lösung von 18° C 4 Minuten lang entwickelt und anschließend 10 Minuten fixiert.

B. Ergebnisse der eigenen Untersuchungen

1. Ultrastruktur nichtinfizierter CEC-Monolayer

Keinerlei Unterschiede sind zwischen lebend abgeschabten, nach der Pelletierung fixierten und vor dem Abschaben in der Flasche fixierten Zellen zu sehen. Jedoch bilden letztere beim Zentrifugieren einen wesentlich lockereren Pellet, so daß die weitere Präparation technisch schwieriger ist. Die Art der Fixierung mit Glutaraldehyd ist ebenfalls ohne Einfluß auf die Morphologie der Kulturen. Die nach der Pelletierung zu beobachtenden Zellformen sind variabel, jedoch herrschen ausgestreckte, ovale oder polygonale Zellen vor. In situ eingebettete

Monolayer zeigen ein einheitlicheres Bild ausgestreckt-polygonaler Zellen.

Elektronenoptisch sind vier verschiedene Zelltypen unterscheidbar (Abb.2).

Typ a

Zellen mit hellem Zytoplasma und wenig freien Ribosomen. Der Kern ist annähernd oval, das Chromatin bis auf einen eventuell vorhandenen, schmalen Heterochromatinsaum an der Kernmembran und den in Ein- oder Mehrzahl vorhandenen Nukleolus gleichmäßig verteilt und sehr aufgelockert, so daß der Kern nur wenig dunkler erscheint als das Zytoplasma. Diese Zellen sind am häufigsten in jungen Kulturen vorhanden.

Typ b

Der Kern ist gelappt, so daß ein Teil der Zellen im Dünnschnitt zwei- oder mehrkernig erscheint. Die Chromatinverteilung und das Zytoplasma sind wie oben beschrieben.

Typ c

Das Zytoplasma ist wesentlich elektronendichter, und es sind mehr freie Ribosomen vorhanden. Auch der Kern ist deutlich kontrastreicher, jedoch Form und Heterochromatinverteilung wie unter a beschrieben.

Typ d

Der kontrastreiche Kern ist gelappt und weist viel, hauptsächlich peripher angeordnetes Heterochromatin auf. Das Zytoplasma ist wie unter c beschrieben.

Die unter c und d genannten Zellen sind insgesamt selten, nehmen aber ebenso wie die unter b angeführten Zellen bei älteren Kulturen an Zahl zu.

Die übrigen Zellorganellen sind in den verschiedenen Zelltypen im allgemeinen von gleicher Struktur und Verteilung, so daß deren Beschreibung, soweit nicht im Einzelfall etwas anderes angegeben wird, für alle vier Erscheinungsformen gilt.

Die Zellen bilden oft dünne, langgestreckte Ausläufer. Die Zellmembran zeigt in jungen Kulturen selten, in älteren Kulturen öfters tiefgehende Membraneinstülpungen. Ebenfalls selten sind kleine, flache Einstülpungen der Zellmembran, die auf eine phago- beziehungsweise pinozytotische Aktivität hinweisen. In ihrem Bereich erscheint die Membran etwas stärker kontrastiert.

Werden RR-behandelte Zellen im Dünnschnitt nicht nachkontrastiert, so wird nur die Zelloberfläche und, soweit vorhanden, Kollagen kontrastreich dargestellt. Das Zellinnere weist nur schwache, osmiumbedingte Unterschiede in der Elektronendichte auf. Auch die Membran einiger Vakuolen ist mit RR beladen. Die RR-Schicht ist auf einer Zelle nicht einheitlich dick, so daß stärker und schwächer RR-positive Zonen miteinander abwechseln. (Abb.3). Ist der Schnitt nachkontrastiert, dann kann in seltenen Fällen die Entscheidung schwierig werden, ob der Kontrast in Vakuolen durch eine geringe Menge RR, die wie an der Zelloberfläche auch in Invaginationen der Zellmembran einmal geringer sein kann, oder nur durch Uranylazetat und Bleizitrat bedingt ist. Degenerierte Zellen zeigen oft eine RR-Bindung an Zytoplasma- und Kernbestandteile.

Der Zellkern weist 1 bis 3 Nukleoli auf. Werden die Kulturen vor der Fixation mit PBS statt mit Medium gewaschen, so treten gehäuft starke Ausweitungen des perinukleären Raumes auf. Äußere und innere Kernmembran stehen aber auch dann noch an den Kernporen in Kontakt miteinander. Wird mit Medium gewaschen, so ist der perinukleäre Raum ein einheitlich schmaler, durch die Kernporen

unterbrochener Spalt.

Die Mitochondrien zeigen im allgemeinen quer oder schräg, manchmal auch längs verlaufende Cristae. Sie sind in seltenen Fällen bizarr geformt und zum Teil auch verzweigt (Abb. 5a). Letzteres ist häufiger in älteren Kulturen zu finden.

Das RER ist wenig ausgeprägt, verläuft manchmal in Stapeln parallel zur Zelloberfläche und ist nicht selten zisternenartig erweitert. Diese Zisternen besitzen einen homogenen Inhalt, dessen Kontrastierbarkeit etwa der der öfters vorkommenden Lipidvakuolen entspricht.

Lysosomen und Autophagievakuolen (Abb. 4) kommen besonders in Abhängigkeit von Kulturmedium und Kulturalter vor. In Eagle's MEM gehaltene ÇEC besitzen die wenigsten Autophagievakuolen und Lysosomen. Sie sind bei mit Lavit inkubierten Zellen besonders häufig und stellen bei manchen von diesen die vorherrschenden zytoplasmatischen Organellen dar. Das McCoy-Medium nimmt diesbezüglich eine Mittelstellung ein. Autophagievakuolen treten mit fortschreitendem Alter der Kulturen in steigendem Maße auf. Sie enthalten hauptsächlich Myelinfiguren, Zytoplasmotropfen und amorphes Material mittlerer Elektronendichte. Ein geringer Teil der Autophagievakuolen weist korbhenkel- und ringförmige Strukturen auf, wie sie auch von PFEIFER (1973) beschrieben werden. Ihre Membran trägt einen schmalen, schlecht begrenzten "inner coat". Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit denen von BUCKLEY (1973) und PFEIFER (1973).

Optisch leere Vakuolen sind mit fortschreitendem Alter der Kulturen in erhöhter Zahl festzustellen. Der Golgi-apparat ist mittelmäßig entwickelt, Mikrotubuli sind ebenso wie das von ABERCOMBIE, HEAYSMAN und PEGRUM (1971)

erwähnte Filamentbündel unter der Zelloberfläche (Abb. 5b) erkennbar. Auch Zentriolen sind manchmal zu sehen (Abb. 4). Freie Ribosomen sind in seltenen Fällen in zickzackartigen Mustern, in parallelen Streifen oder kristalloid angeordnet. Die beiden letzten Formen sind nur in Zellen mit elektronendichtem Zytoplasma vorhanden.

In den Kulturen ist schon 24 Stunden nach der Aussaat des öfteren Kollagen und selten das von YARDLEY und BROWN (1965) gefundene "broad band material" zu beobachten. Zur Bildung beider Strukturen ist die Zelle auch dann befähigt, wenn sie nicht auf einer Unterlage anwachsen kann. Das "broad band material" wird sogar in Suspensionskulturen (Flasche mit Agar ausgegossen, auf dem die Zellen dann nicht anwachsen) in deutlich stärkerem Maße gebildet (Abb. 5c, d).

Vereinzelt sind im CEC-Monolayer auch Leukozyten, die teilweise Phagozytose zeigen, Erythrozyten und nicht näher definierbare, blastenartige Zellen (Abb. 6) anzutreffen. Letztere sind den von SMALL und DAVIES (1972) beschriebenen blutbildenden Zellen aus dem Dottersack von Hühnerembryonen ähnlich.

2. Ultrastruktur der Vermehrung des KP-Virus im CEC-Monolayer

a. Virusaufnahme

In den nach 10 Minuten Adsorption geernteten Kulturen sind Viruspartikel an der gestreckten Zellmembran angelagert zu sehen. Sie liegen auch in von der Zelloberfläche ausgehenden Membraneinstülpungen und, von einer sie

eng umschließenden Membran umgeben, im Zytoplasma der CEC. Die letzteren unterscheiden sich von den anderen Viruspartikeln durch die oft unklare Darstellung ihrer Unterstrukturen, so daß das Core homogener erscheint, die Membranen zum Teil in ihrer Kontinuität unterbrochen und die Spikes unter Umständen kaum noch als solche zu erkennen sind. Auch die das Viruspartikel umgebende Zellmembran weist ab und zu Unterbrechungen auf. In solchen Fällen stellen sich je nach Erhaltungsgrad die Spikes, die Virusmembran oder das an dieser Stelle nackt erscheinende Core in direktem Kontakt zum Zytoplasma dar. Diese Bilder sind bis 30 Minuten nach der Zugabe der Virussuspension zu sehen (Abb. 7a-d).

Ebenfalls schon nach 10 Minuten treten gehäuft Einstülpungen der Zellmembran auf, die ein mehrfaches der Virusgröße erreichen können. Die eingestülpten Membranabschnitte sind verdickt, stärker kontrastiert und auf beiden Seiten von einer unscharf begrenzten, stärker als das Zytoplasma kontrastierten Schicht bedeckt. In den Invaginationen ist im allgemeinen kein, in seltenen Fällen ein kaum strukturierter, mäßig elektronendichter Inhalt. Diese Membranveränderungen finden sich bis vier Stunden p.i. in verstärktem Maße (Abb. 8a, b).

b. Virusreplikation und -ausschleusung

Im Laufe der Infektion nehmen die Zellorganellen an Zahl und Größe zu. Insbesondere das RER und der Golgiapparat sind verstärkt ausgebildet und oft zisternenartig erweitert. Der Inhalt der RER-Zisternen entspricht dem der oben beschriebenen Zisternen in älteren Kulturen.

Ab der 3. Stunde p.i. ist ein "budding" neugebildeter Viruspartikel an der Zelloberfläche zu beobachten. Es werden manchmal fadenartige Viruspartikelkomplexe

gebildet. Liegen mehrere solcher Komplexe nebeneinander, so erscheinen die Viruspartikel in regelmäßiger, dichtgepackter Anordnung (Abb. 9a, b). Die Virusausschleusung erreicht etwa 8 Stunden p.i. ihr Maximum. Ab der 6. Stunde p.i. zeigen fast alle intakten Zellen knospende Viruspartikel an ihren Oberflächen.

Vereinzelte ist schon 3 Stunden p.i. neben der geschilderten Virusbildung auch eine solche an den Membranen von optisch leeren und autophagischen Vakuolen zu beobachten, die bis etwa 8 Stunden p.i. zunimmt und maximal in ungefähr 3-5 % der Zellen zu sehen ist. Parallel zu knospenden Bezirken sind auch freie Viruspartikel in solchen Vakuolen vorhanden. Die Zellen mit intravakuolären Viruspartikeln sind relativ oft den morphologischen Typen b, c und d zuzuordnen (Abb. 10, 11). Zellen, die virushaltige Vakuolen besitzen, zeigen jedoch auch immer die beschriebene Virusausschleusung an der Zelloberfläche.

In Serienschnitten ist das räumliche Verhalten solcher virushaltigen Vakuolen verfolgt worden. Dabei wies ein Teil eine offene Verbindung des Vakuolenlumens mit dem extrazellulären Raum auf. Bei anderen war keine solche Verbindung zu sehen. Jedoch konnte keine der letzteren Vakuolen vollständig im Serienschnittband untersucht werden, da immer mindestens ein Schnitt aus der jeweiligen Serie durch einen Netzbalken verdeckt war (Abb. 12).

Im Kern erscheinen 6-8 Stunden p.i. elektronendichte Flecken unterschiedlicher Größe (etwa zwischen 50 und 100 nm), die unregelmäßig verteilt, jedoch in Nukleolusnähe akkumuliert sind (Abb. 13). Diese Flecken unterscheiden sich morphologisch von aggregiertem Chromatin, das in größerer Menge etwa ab 9-12 Stunden p.i. in vielen Kernen zu sehen ist, durch Form und Verteilung. Die

Mitochondrien nehmen in diesem Infektionsstadium öfters bizarre Gestalt an, die Zahl der Vakuolen ist stark erhöht. Zur selben Zeit steigt auch die Zahl der Zellen mit Degenerationserscheinungen wie extremer Vakuolisierung, Chromatinmargination und Karyorhexis merklich an. Gleichzeitig vergrößert sich der Anteil der Zellen der Typen c und d. In noch älteren Kulturen nimmt die Zahl der degenerierten Zellen zu; nach ca. 30 Stunden p.i. sind fast keine intakten Zellen mehr zu finden. Der Monolayer ist zu diesem Zeitpunkt weitgehend abgelöst. Die der Unterlage anhaftenden Teile bestehen fast ausschließlich aus Membranaggregaten, an denen einzelne Viruspartikel adsorbiert sind. In seltenen Fällen sind auch 48 Stunden p.i. noch einige Zellen zu finden, die nur eine vakuoläre Degeneration und Chromatinmargination zeigen. An diesen Zellen sind vereinzelt noch knospende Viruspartikel zu sehen.

Neben kompletten Viruspartikeln lassen sich von der 8. Stunde p.i. an Virusstrukturen nachweisen, deren Zentrum leer erscheint. Sie zeigen morphologische Ähnlichkeit mit den inkompletten Viruspartikeln.

Solange noch keine hochgradigen Degenerationserscheinungen auftreten, kann man Zellen beobachten, die Virusbildung zeigen und Kollagen an ihrer Oberfläche angelagert haben.

In einigen Kulturen sind Zellen zu Gruppen eng zusammengelagert. Zwischen diesen Zellen bilden sich viele "Zonulae adhaerentes" ("intermediate junctions") (FAWCETT, 1969; STOCKINGER, 1969) aus. Gegenüber der Umgebung grenzen sich die Zellgruppen durch eine Mikrovilli tragende Außenschicht ab. In diesen Zellkomplexen, die in 1, 3, 4 und 9 Stunden p.i. geernteten Kulturen auftraten, sind keine Anzeichen für eine Virusvermehrung

feststellbar (Abb. 14).

In den vereinzelt anzutreffenden Leukozyten und blasenartigen Zellen ist mitunter ein "budding" neugebildeter Viruspartikel zu sehen.

3. Ultrastruktur mit KP-Viren infizierter CEC-Monolayer nach Rutheniumrotkontrastierung

Das Verhalten der Zellen gegenüber RR ist wie bei nichtinfizierten CEC. Die Zellmembran ist auch im Bereich knospendender Viruspartikel RR-positiv.

Von den frei liegenden Viruspartikeln lagern nur die Spikes RR an; allerdings in solchem Maße, daß sie insgesamt gegenüber normal kontrastierten Viruspartikeln vergrößert erscheinen. Das Core mit RR kontrastierter Viruspartikel stellt sich oft dunkler und homogener dar, besitzt jedoch manchmal auch das normale gefleckte Aussehen. Außerdem sind Viruspartikel mit elektronenoptisch leerem Core und RR-positiver Hülle zu finden. In optisch leeren Vakuolen, deren Membranen RR-Anlagerung zeigen, sind oft RR-positive Viruspartikel zu beobachten. Die Viruspartikel knospen auch in diese Vakuolen (Abb. 15).

In optisch leeren und in autophagischen Vakuolen, deren Membranen keine Anlagerung von RR zeigen, sind in etwa 3 % der Zellen Viruspartikel zu sehen, deren Spikes ebenfalls kein RR gebunden haben. Auch ein Knospen der Viruspartikel in solche Vakuolen ist zu erkennen (Abb. 16, 17, 18). Wird der Schnitt nachkontrastiert, so kann unter Umständen die Entscheidung schwierig werden, ob der Kontrast der Vakuolenwand und der Spikes durch eine geringe Menge RR, die wie an der Zelloberfläche auch in Invaginationen einmal geringer sein kann, oder durch Uranylazetat und Bleizitrat bedingt ist.

4. Ultrastruktur mit KP-Virus infizierter und mit Concanavalin A inkubierter CEC-Monolayer

Nach 9 Stunden Infektion und gleichzeitiger Inkubation mit Con A zeigen etwa 80 % der Zellen hochgradige Degenerationserscheinungen in Form von ausgeprägter Vakuolisierung, Chromatinmargination, Karyorhexis und Karyolysis. Ein Teil dieser offensichtlich toten Zellen weist eine RR-Anlagerung an allen Zellorganellen auf (Abb. 19, 22), wie sie LUFT (1971) für Zellen mit nicht mehr intakter Zellmembran beschrieben hat.

In etwa der Hälfte der überlebenden Zellen sind Viruspartikel in optisch leeren und in autophagischen Vakuolen zu finden, die nicht mit RR kontrastiert sind. Auch ein "budding" von Viruspartikeln in solche Vakuolen ist festzustellen. Die Viruspartikel in diesen Vakuolen weisen kein RR in ihrer Hülle auf und liegen zum Teil in kristalloider Anordnung (Abb. 19, 20).

Eine Ausschleusung von Viruspartikeln an der Zelloberfläche ist wesentlich seltener zu beobachten als in infizierten Kontrollkulturen ohne Con A.

Die überlebenden Zellen zeigen relativ häufig eine kristalloide Anordnung freier Ribosomen und eine erhöhte Zahl an Autophagievakuolen (Abb. 21, 22). Sie gleichen ansonsten in ihrer überwiegenden Zahl den oben beschriebenen Zelltypen c und d.

In infizierten Kontrollkulturen ohne Con A sind in bis zu 30 % der Zellen und in nichtinfizierten, mit Con A inkubierten Kontrollkulturen in etwa 50 % der Zellen die oben beschriebenen starken Degenerationserscheinungen zu beobachten.

IV. DISKUSSION

1. Ultrastruktur nichtinfizierter CEC-Monolayer

Es besteht eine weitgehende Übereinstimmung der eigenen ultrastrukturellen Befunde an jungen (Zelltyp a) und älteren (Zelltypen b, c und d) CEC mit den in der Literatur angegebenen (YARDLEY, HEATON, GAINES und SHULMAN, 1960; DI STEFANO und DOUGHERTY, 1965; YARDLEY und BROWN, 1965; COURINGTON und VOGT, 1967; HEINE, LANGLOIS, RIMAN und BEARD, 1969; ABERCOMBIE, HEAYSMAN und PEGRUM, 1971; BROCK und HAY, 1971; MARALDI, BIAGINI, SIMONI, BARBIERI, MARINI und BERSANI, 1973; PERDUE, 1973).

Die Darstellung der CEC mit Hilfe der RR-Kontrastierung erbrachte ebenfalls keine Abweichungen von den Literaturangaben (MARTINEZ-PALAMO und BRAILOVSKY, 1968; MORGAN, 1968; MARTINEZ-PALAMO, 1970; LUFT, 1971; CIAMPOR, 1972). Die Vakuolen mit RR-positiver Wand sind als quergeschnittene Invaginationen der äußeren Zellmembran zu deuten. Bei Zellen, die eine RR-Anlagerung an Zytoplasma- und Kernbestandteile zeigen, ist nach LUFT (1971) eine Zerstörung der äußeren Zellmembran anzunehmen.

2. Ultrastruktur der Vermehrung des KP-Virus im CEC-Monolayer

a. Virusaufnahme

Die eigenen Befunde sprechen für eine Phagozytose der Viruspartikel durch die CEC und Freisetzung des Virusgeoms in den Phagozytosevakuolen. Es wurden nämlich nur selten morphologisch veränderte Viruspartikel an der

äußeren Zellmembran entdeckt, dagegen waren die meisten in zytoplasmatischen Vesikeln eingeschlossenen Viruspartikel morphologisch mehr oder weniger stark verändert. Auch die in Einstülpungen der äußeren Zellmembran liegenden Viren sprechen für einen Phagozytosevorgang.

Diese Schlußfolgerung stimmt mit der Annahme verschiedener Autoren (FAZEKAS DE ST. GROTH, 1948; CHOPPIN und DALES, 1962; BÄCHI, 1970; STERZ, 1972; BOSSART, MEYER und BIENZ, 1973) überein, während sie den Ansichten von HOYLE (1962), MORGAN und ROSE (1968) und BLASKOVIC, RHODES, DOANE und LABZOFFSKY (1972) widerspricht.

Da bei der Bewertung der Anlagerungs- und Abbaustadien von Viren an und in der Zelle die Gefahr der zu weit gehenden Interpretation groß ist (DALES, 1973), sind die eigenen Befunde nur als Indiz, jedoch nicht als eindeutiger Beweis für eine ausschließliche Viropexis anzusehen. Eine eventuell vorhandene, wesentlich seltenere und damit schlechter zu entdeckende Fusion zwischen Viruspartikeln und äußerer Zellmembran, die zur Infektion der Zellen ausreichen könnte, ist als zusätzlich vorhandener Mechanismus nicht mit Sicherheit auszuschließen.

Da an den bis zu vier Stunden p.i. gehäuft anzutreffenden, meist leeren Zellmembranverdickungen und -einstülpungen variabler Größe nie virusspezifische Bestandteile gefunden wurden, ist nicht anzunehmen, daß diese im Laufe einer Viropexis entstehen. Sie sind vielmehr als Ausdruck vermehrter Pinozytoseaktivität der Zellen anzusehen. Da diese Veränderungen nur in infizierten Kulturen in verstärktem Maße vorkommen, ist eine Stimulation der entsprechenden Zellaktivitäten durch die Viren im frühen Infektionsstadium zu vermuten. Eine Stimulierung der Phagobeziehungsweise Pinozytoseaktivität mit Influenzaviren

infizierter Zellen beobachteten auch BÄCHI (1970) und BOSSART, MEYER und BIENZ (1973). Eine der Aufteilung in Virus- (normale Zellmembran) und Nicht-Virus-Phagozytose (verdickte und stärker kontrastierte Zellmembran) vergleichbare Selektion der phagozytierten Partikel und Viren in einer Zelle beschreibt BÄCHI. (1970).

Die obigen Membraneinstülpungen treten auch schon nach 10 Minuten auf, wenn die Kulturen nur mit 10 PBE pro Zelle infiziert wurden und sind somit nicht als durch eine hohe Infektionsmultiplizität bedingt deutbar. Sie sind so typisch, daß mit ihnen eine Altersbestimmung der Infektion in den ersten vier Stunden mit Sicherheit vorgenommen werden kann. Die Kulturen zeigen innerhalb der ersten 3 Stunden p.i. Invaginationen und keine knospenden Viruspartikel, 3 bis 4 Stunden p.i. Invaginationen und knospende Viruspartikel und mehr als vier Stunden p.i. keine Invaginationen, aber knospende Viruspartikel.

In den eigenen Versuchen konnte eine Virusaufnahme nach mehr als 30 Minuten Infektion nicht mehr beobachtet werden. Auch war nie zu sehen, daß neugebildete Viruspartikel wieder in eine Zelle eintreten. Dies stimmt mit der Ansicht von FRANKLIN und HENRY (1960) überein, daß eine Readsorption der Viruspartikel ohne Bedeutung im Vermehrungszyklus der Influenzaviren ist.

b. Virusreplikation und -ausschleusung

In den ein bis zwei Stunden p.i. geernteten Kulturen konnten bis auf die oben diskutierten Invaginationen keine Veränderungen festgestellt werden. Das in den eigenen Kulturen ab 3 Stunden p.i. auftretende "budding" neugebildeter Viruspartikel an der Zelloberfläche entspricht

morphologisch den Beobachtungen von COMPANS und DIMMOCK (1969); allerdings mit dem Unterschied, daß in späteren Infektionsstadien ab und zu auch inkomplette Viruspartikel mit optisch leerem Core vorkommen. Ihnen fehlt die von MOORE, DAVIES, LEVINE und ENGLERT (1962) sowie auch von MORGAN, HSU und ROSE (1962) für diese Partikel angegebene ausgeprägte Pleomorphie. Das Auftreten von Influenzaviruspartikeln mit optisch leerem Core ist nach WHITE (1974) als normal anzusehen und erfolgt mit zunehmender Infektionsdauer in steigendem Maße (NAYAK, 1972).

Die eindeutige Kontrastierung der Zelloberfläche mit RR im Bereich knospender Viruspartikel widerspricht dem Befund von CIAMPOR (1972). Die von CIAMPOR und TURCAN (1972) beschriebenen fibrillären Strukturen und Filamente konnten nicht nachgewiesen werden. Auch die Angabe dieser Autoren, daß knospende KP-Viruspartikel in CEC-Kulturen erst 8 Stunden p.i. an der Zellmembran erscheinen sollen, ist nicht zu bestätigen.

In den eigenen Kulturen konnten freie und knospende Viruspartikel in Vakuolen dargestellt werden. Jedoch war ein Teil dieser Vakuolen mit zellulärem Material gefüllt, so daß sie als sekundäre Lysosomen oder Autophagievakuolen anzusprechen sind. Mit Hilfe von Serienschnitten ließ sich zeigen, daß das Lumen eines Teiles der virushaltigen Vakuolen offensichtlich nicht mit dem extrazellulären Raum in Verbindung steht. Jedoch war auch in den günstigsten Serienschnittbändern immer mindestens ein Schnitt durch einen Netzbalken verdeckt, so daß nicht mit Sicherheit auszuschließen war, daß eventuell von hier aus eine direkte oder indirekte Verbindung zum extrazellulären Raum bestand.

Um diese technische Schwierigkeit zu umgehen, wurde die Darstellung der Zelloberfläche mit Rutheniumrot vorgenommen. Dabei stellte sich heraus, daß ein Teil der Vakuolen, die nicht immer nur an der Zellperipherie liegen müssen, mit RR kontrastiert ist und somit querschnittene Invaginationen der äußeren Zellmembran darstellt. Wenn man nicht allzu stark mit Uranylazetat und Bleizitrat nachkontrastiert, lassen sich RR-kontrastierte und RR-negative Membranen beziehungsweise Viruspartikel leicht unterscheiden. Da in einem Teil der virushaltigen Vakuolen, die sich RR-negativ verhielten, Myelinfiguren, Zytoplasmabestandteile und amorphes Material gefunden werden konnten, entsprechen der intravakuoläre Raum und die Vakuolenmembran zumindest nicht mehr völlig dem extrazellulären Raum und der äußeren Zellmembran, denn hier müssen inzwischen für Autophagievakuolen typische Abscheidungsprozesse abgelaufen sein. Damit ist allerdings nicht ausschließbar, daß die Vakuolen ursprünglich einmal durch Abschnürung invaginierter Oberflächenmembranen entstanden sind.

Eine intrazelluläre Bildung von Viruspartikeln war hauptsächlich in den Zelltypen b, c und d zu sehen. Diese Zellen sind als Alterungsformen der CEC anzusehen. Aufgrund der morphologischen Veränderungen ist auch eine Veränderung im Stoffwechselgeschehen solcher Zellen anzunehmen. Ihr Anteil an der Gesamtkultur nimmt im Laufe der Infektion zu. So liegt der Schluß nahe, daß eine starke Anreicherung von Viruskomponenten, eventuell kombiniert mit einer Stoffwechselverschiebung in der Zelle, die Wahrscheinlichkeit des intravakuolären "budding" stark erhöht. Dies erklärt auch die Beobachtung, daß das Phänomen in den frühen Phasen der Infektion, wenn noch keine starke Anreicherung von Viruskomponenten in der Zelle stattgefunden hat, wesentlich seltener ist. Im übrigen

ist eine morphologische Unterscheidung solcher Zellen gegenüber Zellen, die nur eine Ausschleusung von Viruspartikeln an der Zelloberfläche zeigen, nicht möglich. Auch ist in allen Fällen intravakuolärer Virusvermehrung das normale "budding" an der Zelloberfläche zu sehen, so daß kein Hinweis auf eine Beeinflussung der normalen Virussyntese besteht.

Das Auftreten von Viruspartikeln in optisch leeren und in autophagischen Vakuolen entspricht den Befunden von STERZ (1972), während MORGAN, HSU, RIFKIND, KNOX und ROSE (1961 a), COMPANS und DIMMOCK (1969) und ANISIMOVA, TUCKOVA und VONKA (1973) intravakuoläre Viruspartikel nur in ansonsten leeren Vakuolen beschreiben.

Die Vergrößerung des Durchmessers der Viruspartikel nach RR-Anlagerung ist entweder durch eine RR-Bindung an Virusbestandteile, die in normal kontrastierten Ultradünnschnitten nicht dargestellt werden, oder durch eine Bildung größerer rutheniumhaltiger Komplexe auf katalytischer Basis (LUFT, 1971) erklärbar. Das meist elektronenoptisch dichtere und homogenere Core kann durch die Überlagerung mit RR-haltigem Virushüllmaterial in der Schnittebene bedingt sein, da die Schnittdicke etwa 40-80 nm beträgt. Dafür spricht auch, daß manchmal normal dargestellte Cores angetroffen werden, was durch einen zentralen, sehr dünnen Schnitt durch das betreffende Viruspartikel zu erklären ist.

Die elektronendichten Flecken in Nukleolusnähe wurden ab vier Stunden p.i. auch von anderen Autoren im gleichen und in anderen Systemen beschrieben (MORGAN, HSU, RIFKIND, KNOX und ROSE, 1961 a; COMPANS und DIMMOCK, 1969; CIAMPOR und TURCAN, 1972; ANISIMOVA, TUCKOVA und VONKA, 1973).

Die ersteren zeigten, daß diese Strukturen mit Ferritin-konjugierten Antikörpern gegen das Virus reagieren und deshalb möglicherweise das morphologische Substrat des RNP-Antigens darstellen. Dagegen spricht aber der Zeitpunkt des Auftretens dieser Flecken, worauf COMPANS und DIMMOCK (1969) und ANISIMOVA, TUCKOVA und VONKA (1973) bereits hinwiesen. So dürfte es wahrscheinlicher sein, daß diese Strukturen einer Anhäufung nicht gebrauchten Virusmaterials entsprechen. Ihre Lokalisation in Nukleolusnähe legt einen funktionellen Zusammenhang mit dem Nukleolus nahe, jedoch konnte in den eigenen Untersuchungen keine Entwicklung aus dem Nukleolus, wie sie von COMPANS und DIMMOCK (1969) und CIAMPOR und TURCAN (1972) postuliert wird, gefunden werden.

Im Laufe der Infektion scheinen die Zellen eine beschleunigte Alterung durchzumachen, da Zellveränderungen auftreten, die denjenigen in alten, nichtinfizierten Kulturen weitgehend gleichen.

Die gegen die Umgebung durch eine Mikrovilli tragende Außenschicht abgegrenzten Zellkomplexe mit "Zonulae adhaerentes" zwischen den Zellen sind bezüglich ihrer Herkunft und Entstehung ungeklärt. Die Tatsache, daß in ihnen keine neugebildeten Viruspartikel innerhalb 9 Stunden p.i. sichtbar wurden, ist nur hypothetisch erklärbar. So wäre es denkbar, daß durch die Abgrenzung der Zellhaufen gegenüber der übrigen Kultur das Eindringen von Viruspartikeln in den Komplex erschwert wird. Selbst für den Fall, daß die Viruspartikel in den Komplex eindringen könnten, wäre ihre Ausbreitung innerhalb des Zellhaufens durch die "Zonulae adhaerentes" behindert. Auch ist ein länger dauernder Vermehrungszyklus, der von manchen Autoren für andere Influenzavirus-Zellsysteme beschrieben

wird (BÄCHI, 1970; BLASKOVIC, RHODES, DOANE und LABZOFFSKY, 1972; ANISIMOVA, TUCKOVA und VONKA, 1973), aufgrund eines veränderten Zellstoffwechsels vorstellbar. Eine Aussage darüber, ob die Bildung dieser Komplexe virusinduziert ist - sie traten nur in infizierten Kulturen auf - , ist nicht möglich, da nur vier und damit zu wenige Kulturen derartige Strukturen zeigten.

3. Einfluß von Concanavalin A

Con A ist auch ohne eine gleichzeitige Infektion mit KP-Viren für CEC toxisch. Dies stellten auch KAPELLER und DOLJANSKI (1972) fest. Für die Toxizität sprechen neben dem hohen Prozentsatz degenerierter Zellen auch die häufig angetroffenen Ribosomenkomplexe in noch weitgehend intakten Zellen. Gleichartige Ribosomenmuster konnten MARALDI, BIAGINI, SIMONI, BARBIERI, MARINI und BERSANI (1973) durch den Zellstoffwechsel störende Agentien und Behandlungen in CEC provozieren. Die toxische Wirkung von Con A addiert sich bei der Infektion mit der Zellzerstörung durch das Virus.

Das häufige Auftreten intravakuolärer Viruspartikel und das in relativ geringer Ausprägung vorhandene "budding" an der Zelloberfläche lassen sich durch eine Veränderung der äußeren Zellmembran erklären, wie sie von ROTT, BECHT, KLENK und SCHOLTISSEK (1972) postuliert wird. Dabei würde dann der Einbau von Virusmaterial und dessen Ausschleusung an der äußeren Zellmembran erschwert, könnte aber ungehindert an glatten intrazellulären Membranen stattfinden. Dies führt - ein Fließgleichgewicht zwischen den verschiedenen Ausschleusungsarten angenommen - zu einer entsprechend starken Vermehrung intravakuolärer

Virusbildung. Dabei ist allerdings Voraussetzung, daß die Vakuolen nicht während der Inkubationszeit mit Con A von der Zelloberfläche aus durch Abschnürung entstanden sind, da sie sonst auch dieselbe Veränderung wie die Zelloberfläche aufweisen würden, so daß das gleiche Verhältnis zwischen intravakuolärer und peripherer Virusbildung zu erwarten wäre, wie bei nicht mit Con A behandelten Zellen. Insoweit widerspricht diese Hypothese den Annahmen von COMPANS und DIMMOCK (1969) und ANISIMOVA, TUCKOVA und VONKA (1973) bezüglich des Ursprungs virushaltiger Vakuolen.

Da ROTT, BECHT, KLENK und SCHOLTISSEK (1972) keine virusspezifische Aktivität im Medium nach Con A-Behandlung der Zellen feststellen konnten, andererseits aber in den eigenen Untersuchungen neugebildete und ausgeschleuste Viruspartikel darstellbar waren, ist anzunehmen, daß die neugebildeten Viruspartikel funktionell nicht vollwertig sind, obwohl sie morphologisch nicht von normalen KP-Viruspartikeln unterscheidbar sind. Eine direkte Agglutination der Viruspartikel durch Con A (BECHT, ROTT und KLENK, 1972; KLENK, ROTT und BECHT, 1972) ist dabei als Ursache auszuschließen, da der Effekt auch eintritt, wenn Con A nur vor der Infektion in dem Kulturmedium war (ROTT, BECHT, KLENK und SCHOLTISSEK, 1972).

Abschließend kann unter Bezug auf die Aufgabenstellung festgestellt werden, daß es gelungen ist, eine intrazelluläre Bildung von Influenzaviruspartikeln als Besonderheit neben der Reifung der Viruspartikel an der Zelloberfläche nachzuweisen.

Durch Concanavalin A wird die Relation zwischen der Zahl der Zellen, die nur an der Zelloberfläche eine Ausschleusung von Viruspartikeln zeigen, und Zellen, die intravakuoläre Viruspartikel besitzen, stark zugunsten der letzteren verschoben. Concanavalin A setzt die Zahl der ausgeschleusten Viruspartikel an der Zelloberfläche stark herab.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. In der Literaturübersicht werden die bisherigen Kenntnisse über die Ultrastruktur des KP-CEC-Systems und über den Einfluß von Concanavalin A auf dieses System dargestellt. Angaben über die Ultrastruktur anderer Influenzavirus-Zellsysteme werden berücksichtigt. Weiterhin wird die Methodik der Ruthenium-rotkontrastierung erörtert.
2. Es wird eine Methode zur elektronenmikroskopischen Untersuchung in situ eingebetteter Monolayer erarbeitet.
3. Die Ultrastruktur nichtinfizierter CEC-Monolayer in situ und nach verschiedenen Methoden der Behandlung vor und nach der Pelletherstellung wird beschrieben. Es sind vier Zellformen unterscheidbar, die verschiedene Alterungsformen der CEC darstellen. Daneben kommen selten Erythrozyten, Leukozyten und blastenartige Zellen in der Kultur vor.
4. Die eigenen Befunde sprechen dafür, daß die KP-Viruspartikel über eine Viropexis in die Zellen des CEC-Monolayers gelangen.
5. Gleichzeitig mit der Infektion entwickelt sich eine Steigerung der Pinozytoseaktivität der Zellen. Dabei sind morphologische Unterschiede zwischen den die Viruspartikel aufnehmenden Membranbezirken und den an der Pinozytose beteiligten Membranbezirken festzustellen. Die an der Pinozytose beteiligten Membranbezirke sind verdickt, stärker kontrastiert und auf beiden Seiten von einer unscharf begrenzten Schicht

bedeckt, während die an der Viropexis beteiligten Membranbezirke diese Veränderungen nicht aufweisen. Anhand der gesteigerten Pinozytoserate ist unter Berücksichtigung des Auftretens neugebildeter Viruspartikel das Infektionsstadium zeitlich bestimmbar.

6. Ab 3 Stunden p.i. tritt eine Ausschleusung neugebildeter Viruspartikel auf. In maximal 3-5 % der Zellen findet eine Ausschleusung der Viruspartikel in optisch leere und in autophagische Vakuolen statt. Anhand von Serienschnitten und durch Rutheniumrotkontrastierung der Zelloberfläche wird gezeigt, daß in etwa 3 % der Zellen diese virushaltigen Vakuolen keine offene Verbindung zum extrazellulären Raum besitzen. Die Häufigkeit des Auftretens intravakuolärer Viruspartikel ist von dem Infektionsstadium und dem Zelltyp abhängig. Zellen mit intravakuolären Viruspartikeln zeigen auch immer eine Virusausschleusung an der Zelloberfläche.
7. Ab etwa 8 Stunden p.i. treten in vielen Zellkernen elektronendichte Fletken auf, die in Nukleolusnähe akkumuliert sind.
8. Mit fortschreitenden Infektionsstadien treten in steigendem Maße inkomplette Viruspartikel auf.
9. Concanavalin A setzt die Rate der Virusausschleusung an der Zelloberfläche stark herab. Gleichzeitig erhöht sich der Anteil an Zellen, die Viruspartikel in optisch leere und in autophagische Vakuolen ausschleusen, erheblich. Daneben ruft Con A in vielen Zellen hochgradige Degenerationserscheinungen hervor.
10. In einigen Kulturen treten gegen die Umgebung durch eine Mikrovilli tragende Außenschicht abgegrenzte Zellkomplexe mit "Zonulae adhaerentes" zwischen den Zellen auf. In ihnen können keine Anzeichen für eine Vermehrung des KP-Virus festgestellt werden.

SUMMARY

1. The literature on the ultrastructure of the fowl plague virus (FPV)-chick embryo cell-system and the effect of Concanavalin A on this system is reviewed. The ultrastructure of other Influenza-virus-cell-systems is taken into consideration. The staining with ruthenium red is discussed.
2. A method to examine the fine structure of monolayers embedded in situ is communicated.
3. The ultrastructure of the chick embryo cell (CEC)-monolayer in situ and after various methods of fixation before and after centrifugation is described. There are four different types of CEC, which represent different stages of ageing. In some cultures, erythrocytes, leucocytes and blastoid cells may also occur.
4. The electronmicroscopical studies on adsorption and penetration of the virions into the cells led to the assumption that this process is a phagocytosis.
5. With the infection there is a simultaneous increase of pinocytosis of the CEC. The areas of the cell membrane which are involved with pinocytosis have a thickened, markedly contrasted membrane with an inner and outer fuzzy coat, while the areas phagocytosing virions do not exhibit these changes. The stage of the infection can be determined by the increased rate of pinocytosis and the budding process of newly formed virions.

6. Budding virions are visible three hours after infection. In 3-5 % of the cells, budding of the virions into empty and autophagic vacuoles takes place. By serial sections and staining with ruthenium red, it is shown that in approximately 3 % of the cells there is no connection between these vacuoles and the extracellular space. The frequency of intravacuolar virions depends on the duration of the infection and the cell type. All cells with virions in vacuoles show additionally budding at their surface.
7. At about 8 hours after infection electrondense clusters appear accumulated adjacent to the nucleolus.
8. In advanced stages of infection there is an increase of incomplete virions.
9. Concanavalin A causes a decrease of budding virions at the cell's surface and an increase of cells with intravacuolar virions. Besides, it causes degeneration in many cells of the culture.
10. In some cultures there are cellcomplexes with intermediate junctions between the cells. These cellcomplexes have a bordering layer with microvilli. There is no indication of multiplication of the FPV within these complexes.

VI. ABBILDUNGEN

In den gedruckten Exemplaren (DIN A5) sind
alle Vergrößerungsangaben um 32 % zu verringern.

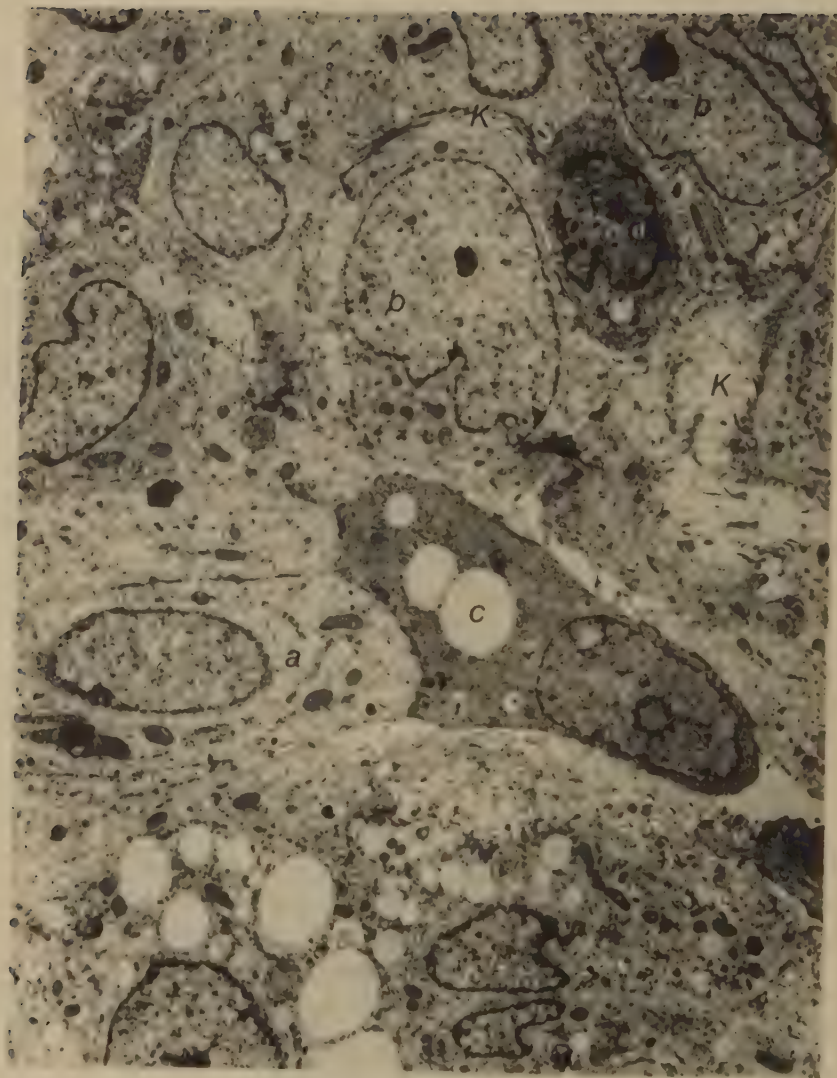


Abb. 2: Übersicht über einen CEC-Monolayer 36 Stunden nach der Aussaat; verschiedene Zelltypen (a, b, c, d), K = Kollagen. 12 000 x (EM.-Nr. 8174)

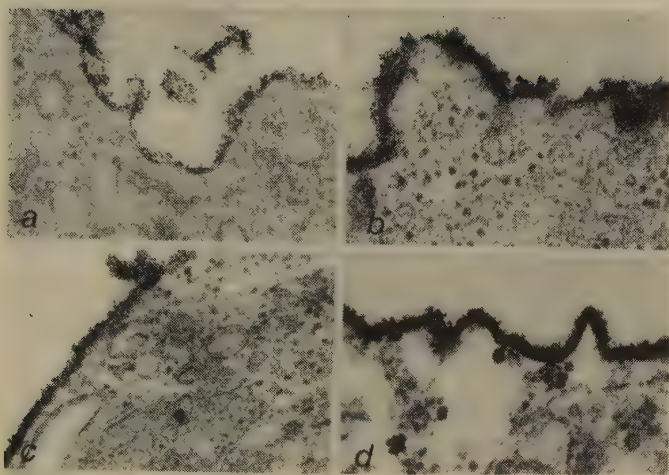


Abb. 3: Verschieden starke RR-Anlagerung an die Zelloberfläche; RR-Kontrastierung, Nachkontrastierung mit Uranylazetat und Bleizitrat.

a: Je 1 Minute nachkontrastiert

b, c, d: Je 10 Minuten nachkontrastiert

90 000 x (EM.-Nr. 9079, 9225, 9242, 9182)

Abb. 4: Zellorganellen einer CEC 24 Stunden nach der Aussaat; A = Autophagievakuolen und sekundäre Lysosomen, a = Ausweitung des perinukleären Raumes (die Kultur wurde mit PBS gewaschen und in PBS abgeschabt), ER = rauhes endoplasmatisches Retikulum (zum Teil ausgeweitet), G = Golgiapparat, K = Kern, M = Mitochondrien, N = Nukleolus, Z = Zentriol.

42 000 x (EM.-Nr. 7806)

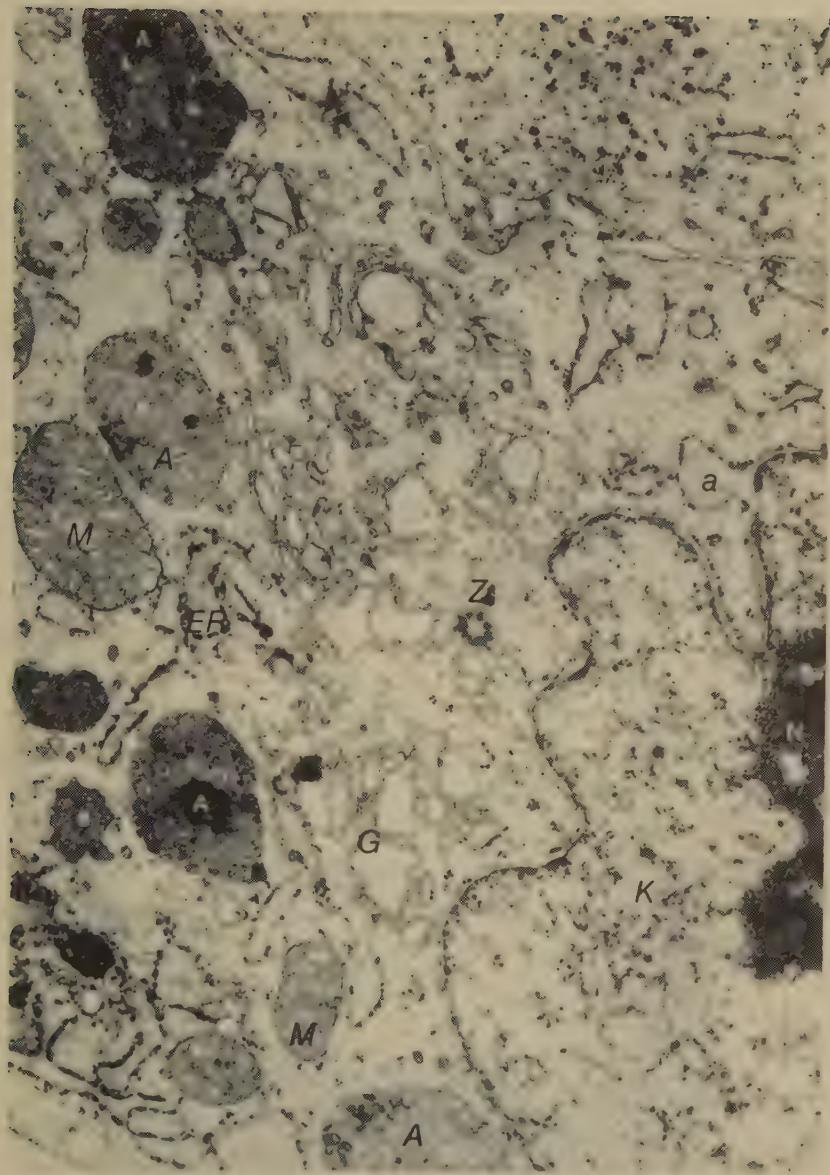


Abb. 4: Zellorganellen einer CEC 24 Stunden nach
der Aussaat.

42 000 x (EM.-Nr. 7806)

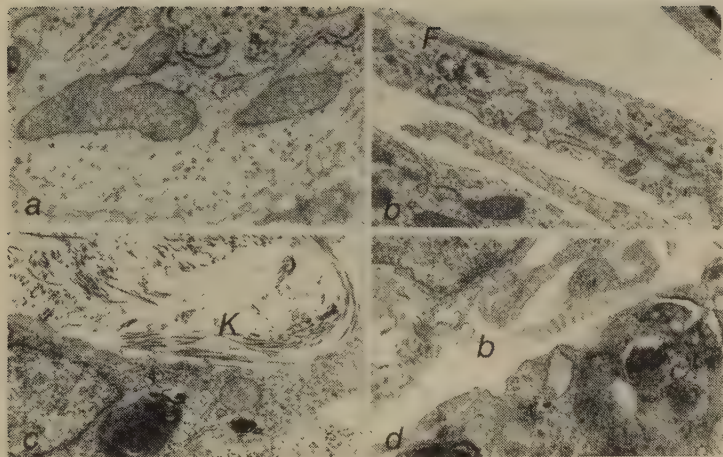


Abb. 5: a: Verzweigtes Mitochondrium. 21 000 x (EM.-Nr. 7805)
 b: Filamentbündel unter der Zelloberfläche (F).
 18 000 x (EM.-Nr. 8387)
 c: Kollagen (K). 15 000 x (EM.-Nr. 7163)
 d: "broad band material" (b). 24 000 x (EM.-Nr. 7857)

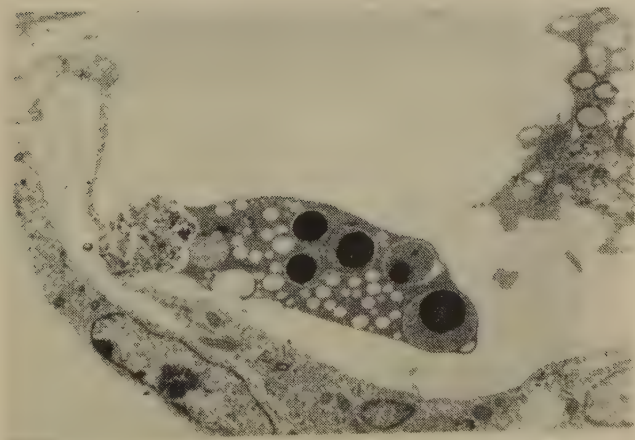


Abb. 6: Blastenartige Zelle. 9000 x (EM.-Nr. 8134)

Abb. 7: Verschiedene Stadien der Virusaufnahme.

- a: Anlagerung eines Viruspartikels an die leicht eingesenkte Zellmembran, 10 Minuten nach Viruszugabe.
140 000 x (EM.-Nr. 8554)
- b: Viruspartikel in tiefer Invagination der Zellmembran, 10 Minuten nach Viruszugabe.
90 000 x (EM.-Nr. 8520)
- c: Viruspartikel in eng umschließenden Vakuolen, verschieden weitgehender Verlust der Unterstrukturen der Viruspartikel, 15 Minuten nach Viruszugabe.
90 000 x (EM.-Nr. 9115)
- d: Viruspartikel in eng umschließender Vakuole, Pfeil = Unterbrechung in der Kontinuität der Viruspartikel- und Vakuolenmembran, 10 Minuten nach Viruszugabe.
210 000 x (EM.-Nr. 8578)

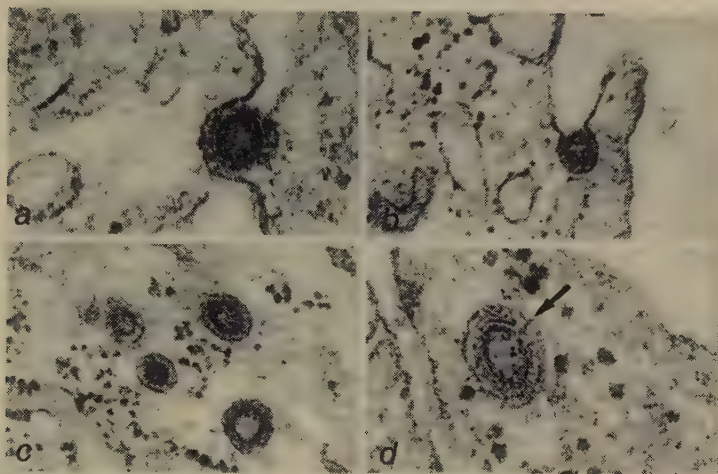


Abb. 7: Verschiedene Stadien der Virusaufnahme

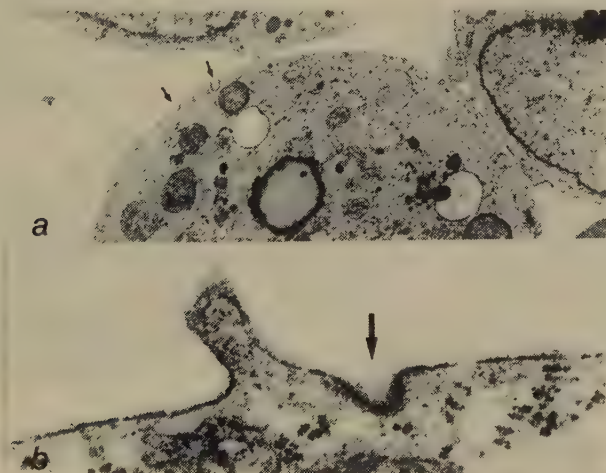


Abb. 8: Pinozytотische Zellmembraneinstülpungen (Pfeile).
a: 20 Minuten p.i. 15 000 x (EM.-Nr. 8568)
b: 5 Minuten p.i., Monolayer in situ geschnitten.
90 000 x (EM.-Nr. 8891)

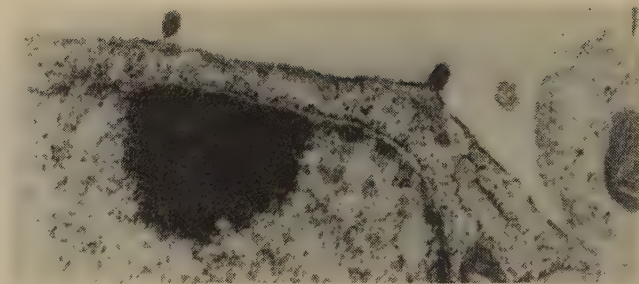


Abb. 9a: Knospende Viruspartikel an der Zelloberfläche,
3 Stunden p.i.
60 000 x (EM.-Nr. 8362)

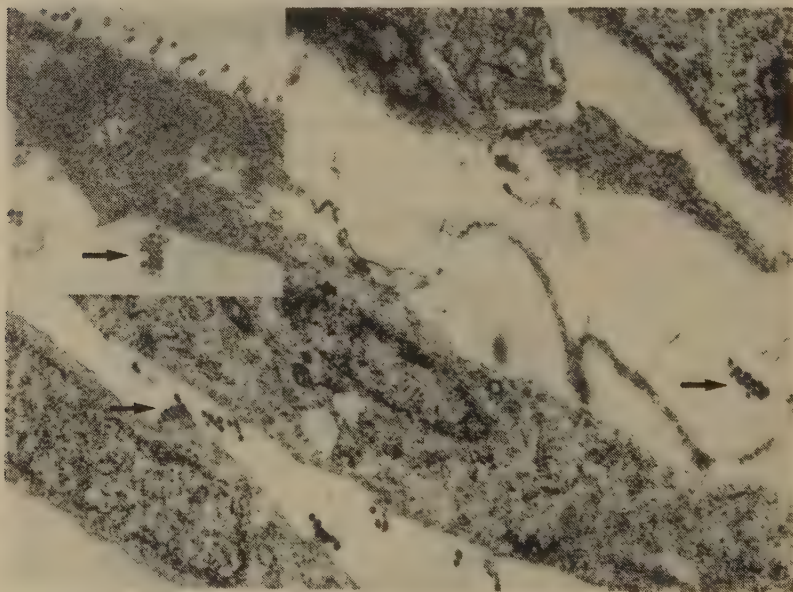


Abb. 9b: Dichtgepackte, regelmäßige Lagerung neugebildeter
Viruspartikel (Pfeile), 5 Stunden p.i.,
Inset: 3 Stunden p.i.
24 000 x (EM.-Nr. 7957, 8123)

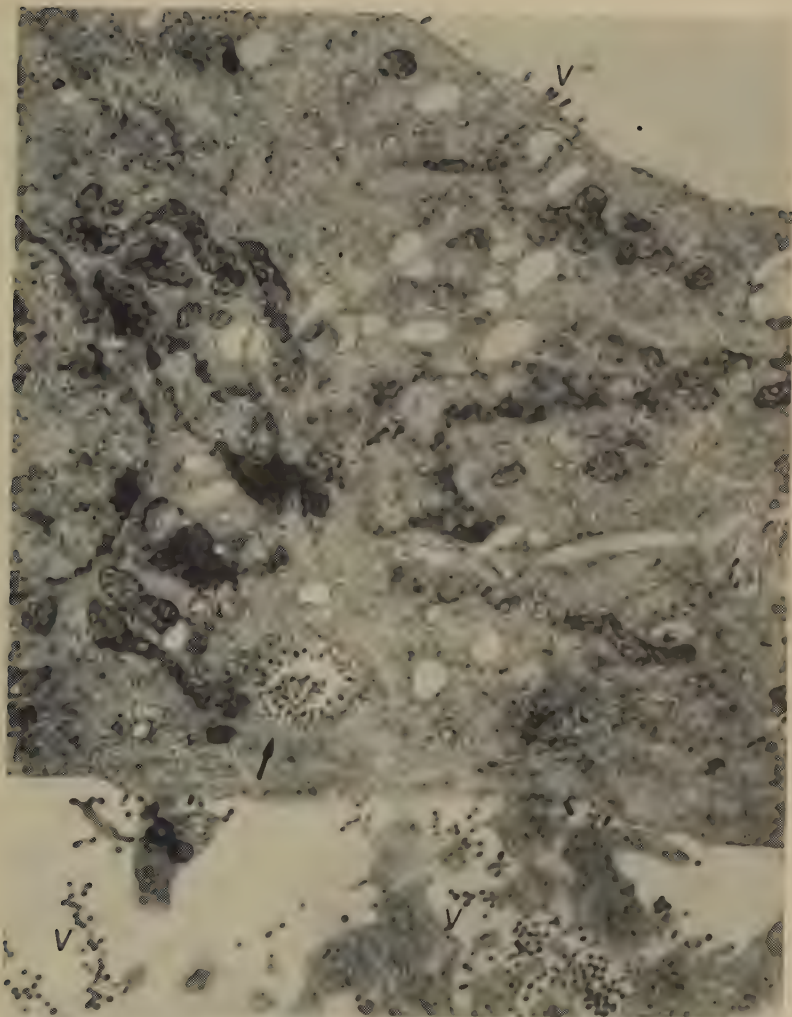


Abb. 10: Monolayer in situ geschnitten, 8 Stunden p.i.
 Pfeil = Viruspartikel in Vakuole,
 V = freiliegende und in Ausschleusung
 begriffene neugebildete Viruspartikel.
 24 000 x (L.-Nr. 8244)

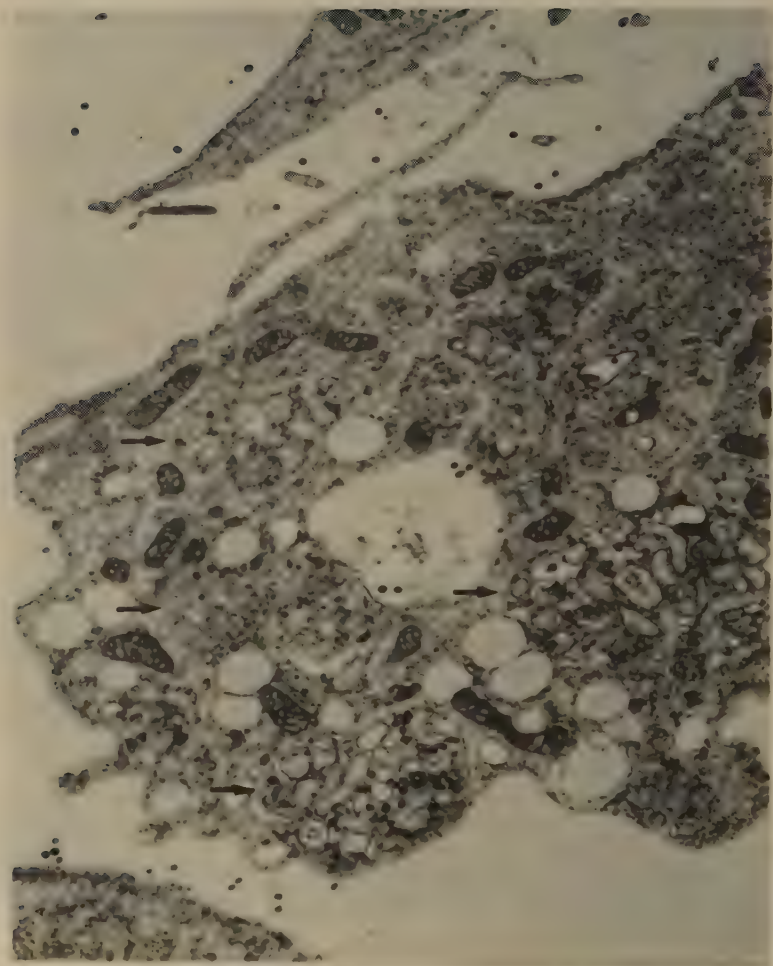


Abb. 11: Viruspartikel in Autophagievakuolen (Pfeile),
die zum Teil korbhenkel- und ringartige
Strukturen enthalten, 12 Stunden p.i.
24 000 x (EM.-Nr. 8269)

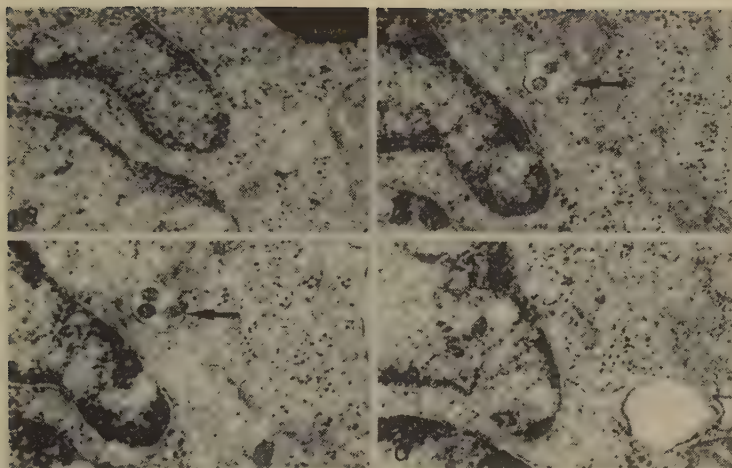


Abb. 12: Schnittserie 7 Stunden p.i.

Pfeile = Vakuole mit Viruspartikeln,
zwischen c und d liegt ein nicht
fotografierter Schnitt.

60 000 x (EM.-Nr. 9314, 9315, 9316, 9317)

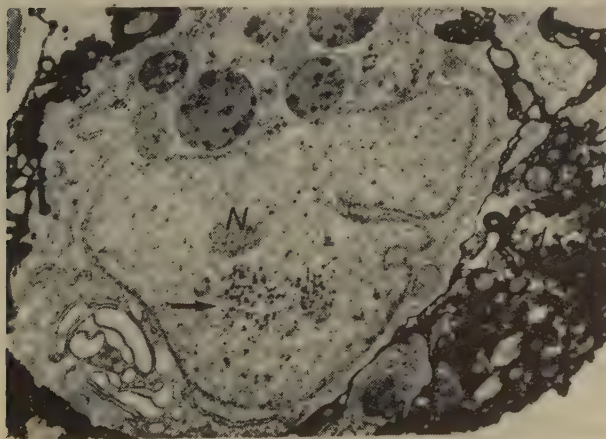


Abb. 13: Elektronendichte Flecken im Kern (Pfeil),
massenhaft neugebildete Viruspartikel an
der Zelloberfläche, N = Nukleolus,
9 Stunden p.i., EM-Kontrastierung, nach-
kontrastiert mit Uranylazetat und Bleizitrat.
15 000 x (EM.-Nr. 8860)

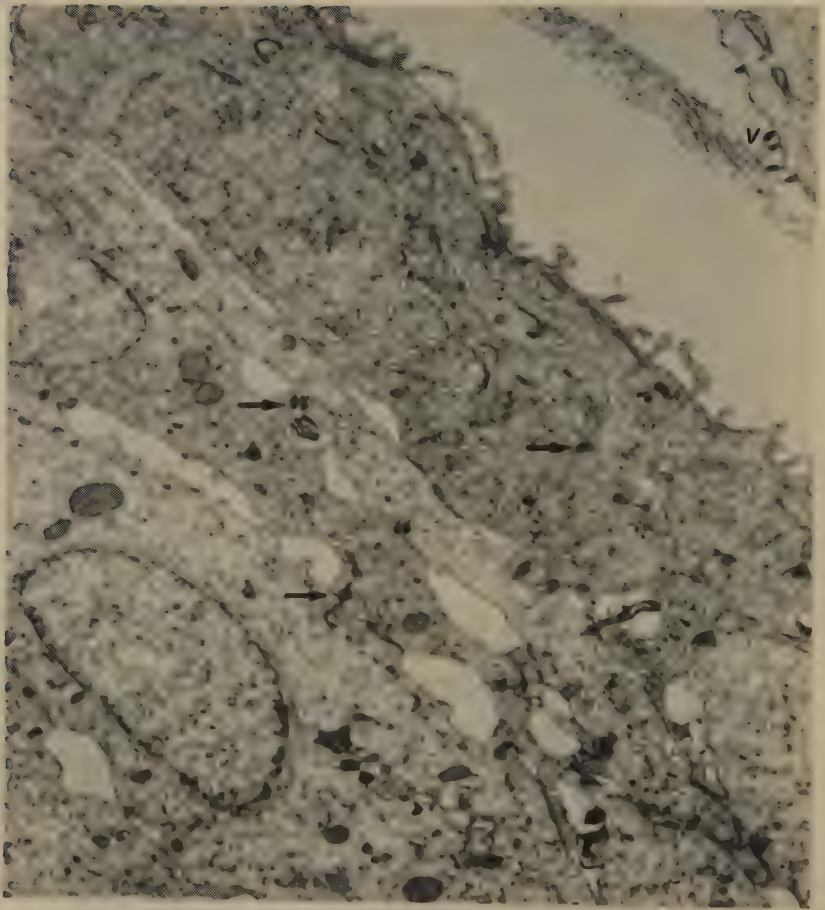


Abb. 14: Gegen die Umgebung durch eine Mikrovilli tragende Schicht abgegrenzter Zellkomplex mit "Zonulae adhaerentes" (Pfeile) zwischen den Zellen, V = neugebildete Viruspartikel außerhalb des Zellkomplexes, 4 Stunden p.i. 24 000 x (EM.-Nr. 8346)

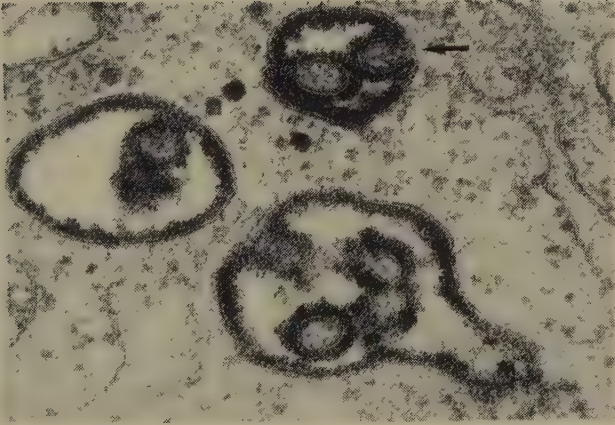


Abb. 15: RR-positive Viruspartikel in Invaginationen
mit RR-positiver Wand, Pfeil = knospendes
Viruspartikel, 9 Stunden p.i.,
RR-Kontrastierung, nachkontrastiert mit
Uranylazetat und Bleizitrat.
150 000 x (EM.-Nr. 9041)

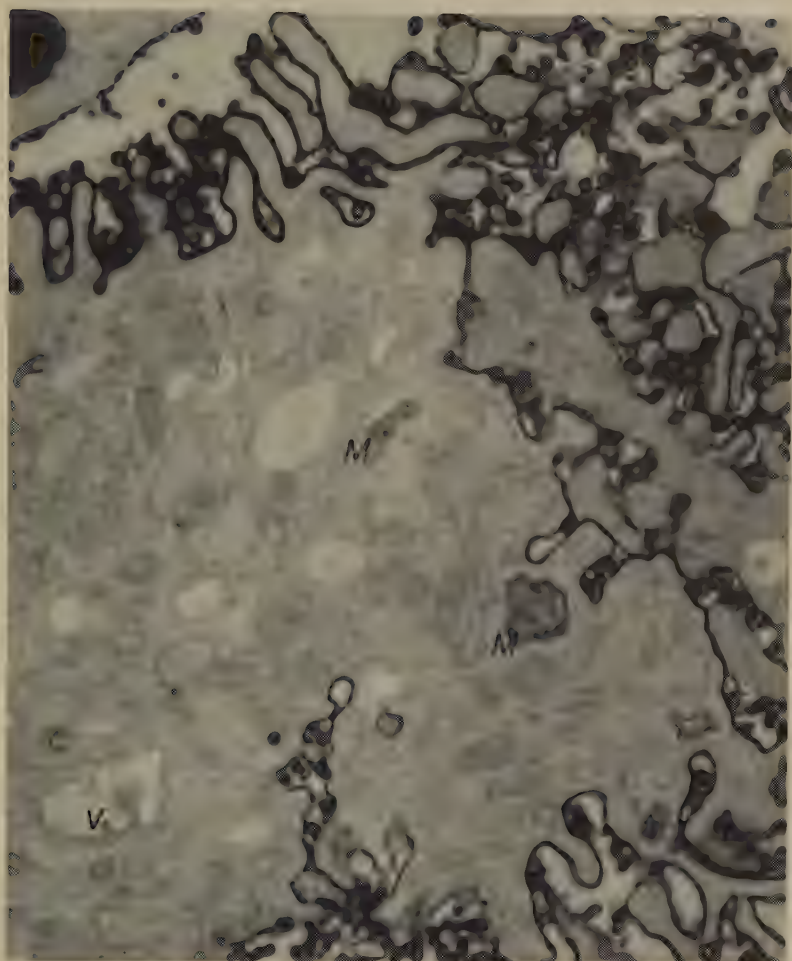


Abb. 16: Massenhaft neugebildete Viruspartikel an der Zelloberfläche, V = RR-negative Viruspartikel in RR-negativer Vakuole, M = Myelinfiguren, 3 Stunden alt., RR-Kontrastierung, nicht nachkontrastiert.
30 000 x (Fh.-Nr. 8620)

Abb. 17: CEC 9 Stunden p.i., G = Golgiapparat,
K = Zellkern, V = Viruspartikel an der
Zelloberfläche, Z = Zentriol,
kleine Pfeile = RR-positive Viruspartikel
in Invaginationen der Zellmembran,
großer Pfeil = RR-negative Viruspartikel
in RR-negativer Autophagievakuole,
Keil = RR-negative Viruspartikel in
RR-negativer Vakuole,
RR-Kontrastierung, nachkontrastiert mit
Uransylazetat und Bleizitrat.
30 000 x (EM.-Nr. 8490)

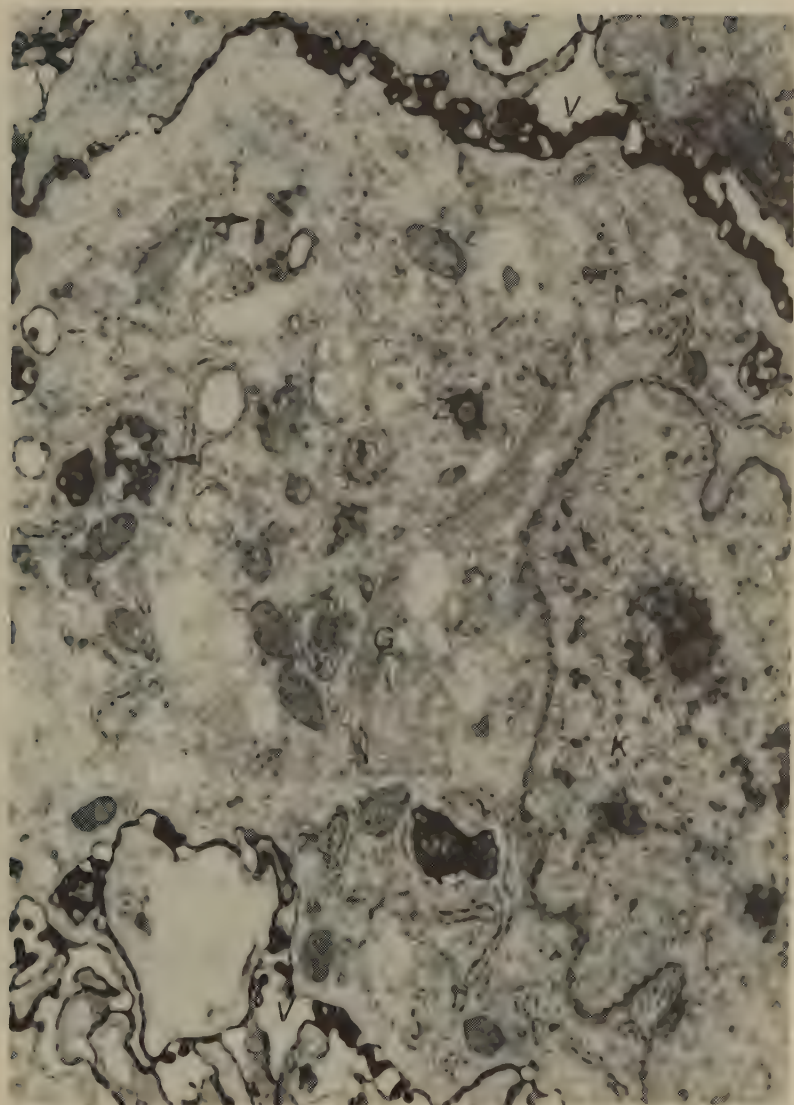


Abb. 17: GSC 1 Bienden p.l., UV-Kontrastierung,
nachkontrastiert mit Uranylazetat und
Elektronen.
30000 x (200000 x 450)

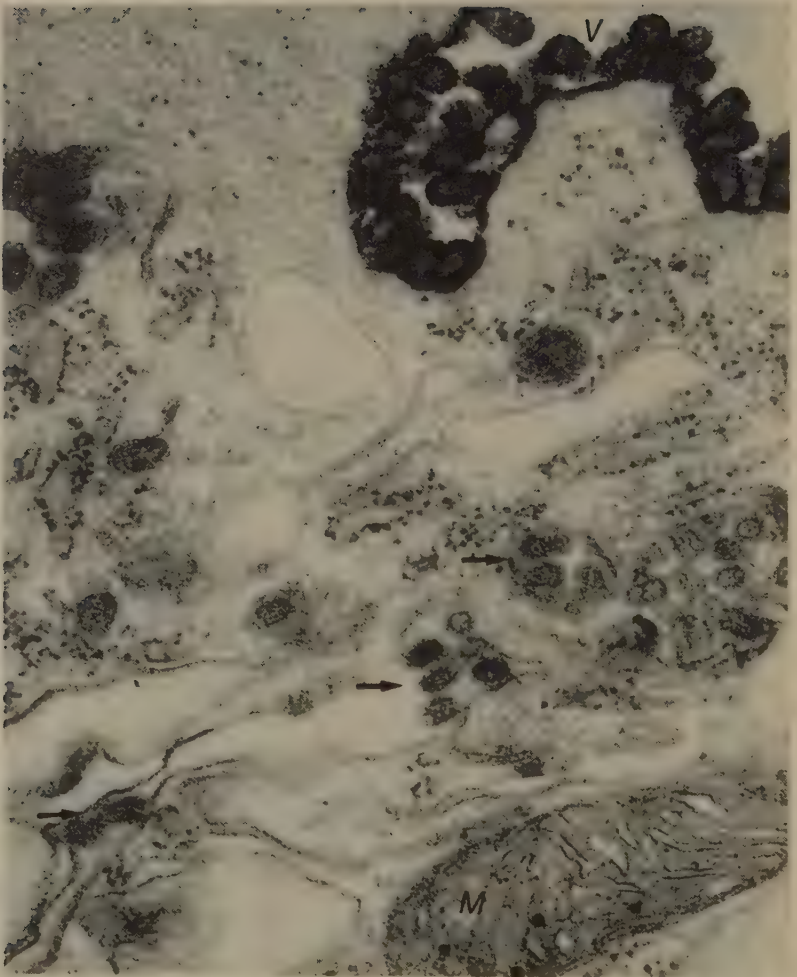


Abb. 18: Intravakuoläre Viruspartikel 9 Stunden
 p.i. (Pfeile), V = Viruspartikel an
 der Zelloberfläche, M = Mitochondrium,
 RR-Kontrastierung, nachkontrastiert
 mit Uranylazetat und Bleizitrat.
 90 000 x (EM.-Nr. 9246)

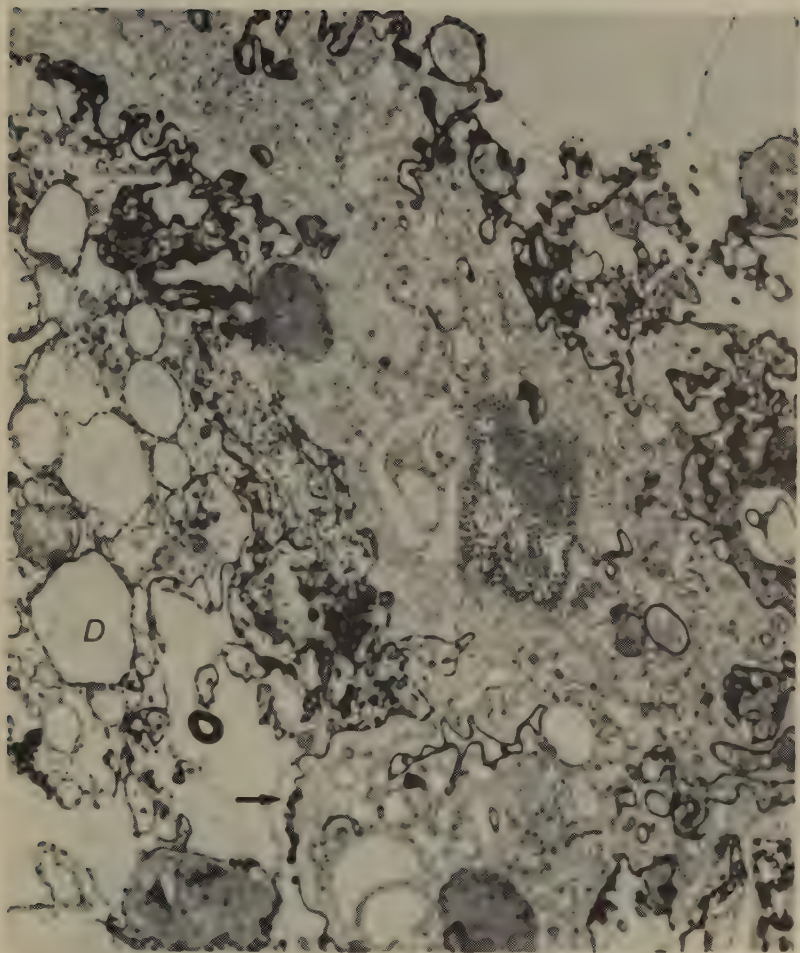


Abb. 19: Intravakuoläre Viruspartikel in kristalloider Anordnung nach Con A-Inkubation, 9 Stunden p.i., Pfeil = Ausschleusung von Viruspartikeln an der Zelloberfläche, D = degenerierte Zelle mit RR-Anlagerung an intrazelluläre Membranen, RR-Kontrastierung, nachkontrastiert mit Uranylazetat und Bleizitrat.
18 000 x (EM.-Nr. 8797)

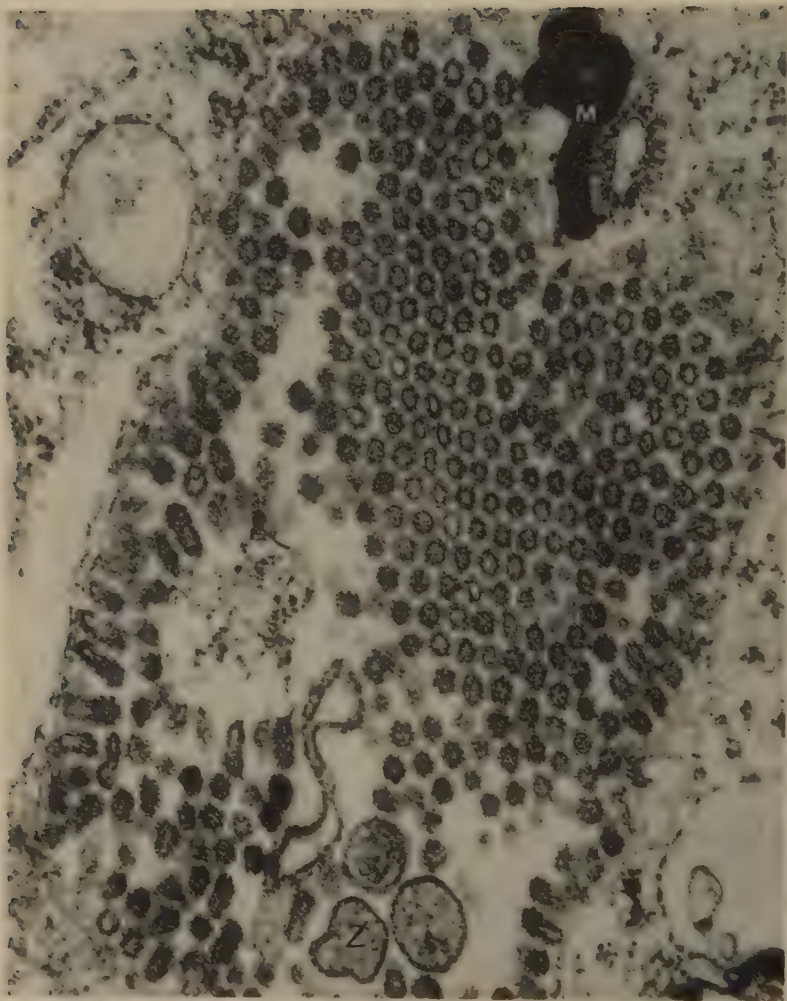


Abb. 20: Ausschnitt aus Abb. 19, RR-negative Viruspartikel mit teilweise optisch leerem Core in kristalloider Anordnung in einer Autophagievakuole, M = Myelinfigur, Z = Zytoplasmotropfen.

90 000 x (EM.-Nr. 8798)

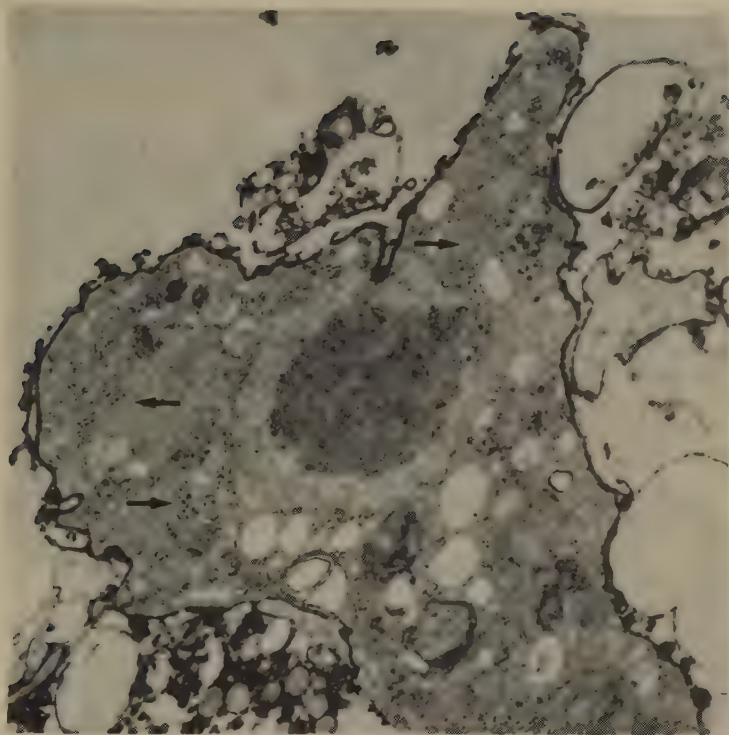


Abb. 21a: Kristalloide Ribosomenanordnung (Pfeile) nach
Con A-Inkubation, 9 Stunden p.i., RR-Kontrastierung,
nachkontrastiert mit Uranylazetat und Bleizitrat.
30 000 x (EM.-Nr. 8833)

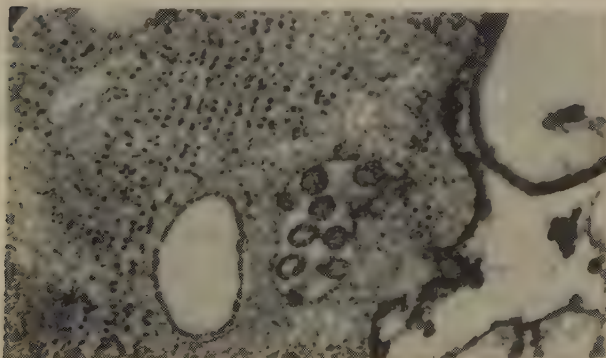


Abb. 21b: Ausschnitt aus Abb. 21a.
90 000 x (EM.-Nr. 8834)

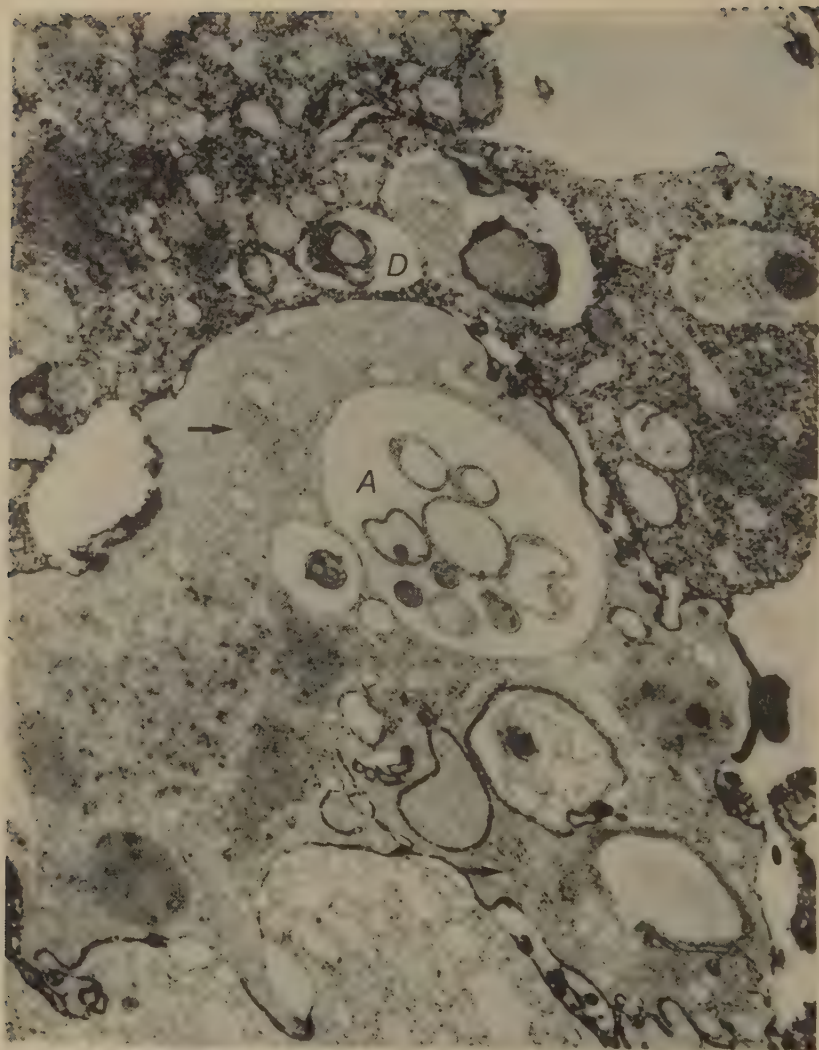


Abb. 22: Kristalloide Ribosomenanordnung (Pfeile) nach
 Con A-Inkubation, 9 Stunden p.i.,
 A = Autophagievakuole, D = degenerierte Zelle
 mit RR-Anlagerung an allen Zellorganellen,
 RR-Kontrastierung, nachkontrastiert mit
 Uranylazetat und Bleizitrat.
 30 000 x (EM.-Nr. 0040)

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Abercombie, M., J.E.M. Heaysman, S.M. Pegrum (1971):
The locomotion of fibroblasts in culture.
IV. Electron microscopy of the leading
lamella.
Exp. Cell Res. 67, 359-367
- Allison, A.C., L. Mallucci (1965): Histochemical
studies of lysosomes and lysosomal enzymes
in virus-infected cultures.
J. exp. Med. 121, 463-475
- Anisimova, E., E. Tuckova, V. Vonka (1973): Morpholo-
gical changes in BHK-21 cells infectes with
 $S/N(H_2H_1)$ influenza virus.
Arch. ges. Virusforsch. 43, 221-235
- Apostolov, K., T.H. Flewett (1965): Internal structure
of influenza virus.
Virology 26, 505-508
- Apostolov, K., T.H. Flewett, A.P. Kendal (1970):
Morphology of influenza A, B, C and
infectious bronchitis virus (IBV)
virions and their replication.
In: R.D. Barry und B.W.J. Mahy: The biology
of large RNA viruses, 3-26, Academic Press
London-New York
- Archetti, I., E. Bereczky, F. Rosati-Valente,
D. Steve-Bocciarelli (1970): Elongated
structures present in cells infectes with
influenza viruses.
Arch. ges. Virusforsch. 29, 275-286

- Bächi, T. (1970): Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Infektionszyklus von Influenza-A-Viren in Ehrlich-Aszites-Tumor-Zellen. Path. Microbiol. 26, 81-107
- Becht, H., R. Rott, H.-D. Klenk (1971): Agglutination of cells infected with myxoviruses by Concanavalin A. Z. Med. Mikrobiol. Immunol. 156, 305-308
- Becht, H., R. Rott, H.-D. Klenk (1972): Effect of Concanavalin A on cells infected with enveloped RNA viruses. J. gen. Virol. 14, 1-8
- Blaskovic, P., A.J. Rhodes, F.W. Doane, N.A. Labzoffsky (1972): Infection of chick embryo tracheal organ cultures with influenza A₂ (Hong Kong) virus. II. Electron microscopy. Arch. ges. Virusforsch. 38, 250-266
- Bossart, W., J. Meyer, K. Bienz (1973): Electron microscopic study of influenza virus hemagglutination: Pinocytosis of virions by red cells. Virology 55, 295-298
- Brock, M.A., R.J. Hay (1971): Comparative ultrastructure of chick fibroblasts in vitro at early and late stages during their growth span. J. Ultrastruct. Res. 36, 291-311
- Buckley, I.K. (1973): The lysosomes of cultured chick embryo cells: A correlated light and electron microscopic study. Lab. Invest. 29, 411-422

- Choppin, P., S. Dales (1962): Attachment and penetration of influenza virus.
Virology 18, 489-493
- Ciampor, F. (1972): Electron microscopy of tissue culture cells infected with myxoviruses.
I. Nucleo-cytoplasmic changes in Ao/WSN influenza virus-infected chick embryo cells.
Acta virologica 16, 9-16
- Ciampor, F., P. Turcan (1972): Electron microscopy of tissue culture cells infected with myxoviruses. II. Nucleo-cytoplasmic changes in fowl plague virus-infected cells.
Acta virologica 16, 177-182
- Compans, R.W., N.J. Dimmock (1969): An electron microscopic study of single-cycle infection of chick embryo fibroblasts by influenza virus.
Virology 39, 499-515
- Compans, R.W., N.J. Dimmock, H. Meier-Ewert (1970):
An electron microscopic study of the influenza virus-infected cell.
In: R.D. Barry und B.W.J. Mahy: The biology of large RNA viruses, 87-108, Academic Press London-New York
- Compans, R.W. (1973): Mündliche Mitteilung
- Courington, D., P.K. Vogt (1967): Electron microscopy of chick fibroblasts infected by defective Rous sarcoma virus and its helper.
J. Virol. 1, 400-414

- Dales, S. (1973): Early events in cell-animal virus interactions.
Bact. Rev. 37, 103-135
- Di Stefano, H.S., R.M. Dougherty (1965): Cytological observations of "nonproducer" Rous sarcoma cells.
Virology 27, 360-377
- Fawcett, D.W. (1969): Die Zelle.
Urban und Schwarzenberg, München-Berlin-Wien
- Fazekas de St. Groth, S. (1948): Viroplexis, the mechanism of influenza virus infection.
Nature 162, 294-295
- Fraenkel-Conrad, H. (1974): Chemie und Biologie der Viren.
Gustav Fischer Verlag Stuttgart
- Franklin, R.M., C. Henry (1960): The multiplication of fowl plague virus in tissue cultures of chick embryo cells.
Virology 10, 406-418
- Heine, U., A.J. Langlois, J. Riman, J.W. Beard (1969): Ultrastructure of chick embryo cells altered by strain MC 29 avian leukosis virus.
Cancer Res. 29, 442-458
- Hoyle, L. (1962): The entry of myxoviruses into the cell.
Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology 27, 113-121
- Kapeller, M., F. Doljanski (1972): Agglutination of normal and Rous sarcoma virus-transformed chick embryo cells by Concanavalin A and wheat germ agglutinin.
Nature New Biology 235, 184-185

- Kato, N., H.J. Eggers (1969): Inhibition of uncoating of fowl plague virus by I-adamantanamine hydrochloride.
Virology 37, 632-641
- Klenk, H.-D., R. Rott, H. Becht (1972): On the structure of the influenza virus envelope.
Virology 47, 579-591
- Kopp, J.V., J.E. Kempf, A.V. Kroeger (1968): Cytoplasmic inclusions observed by electron microscopy late in influenza virus infection of chick embryo fibroblasts.
Virology 36, 681-683
- Kraus, W., W. Schäfer (1963): Apparatur zur Herstellung von primären Kulturen animaler Zellen.
Zbl. Vet. Med. 10, 394-399
- Laufenberg, W. (1973): Interferonunabhängige Hemmung der Herpesvirus-Vermehrung durch Influenzaviren.
Med. Dissertation Gießen
- Luft, J.H. (1971): Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action.
II. Fine structural localization in animal tissues.
Anat. Rec. 171, 347-416
- Maraldi, N.M., G. Biagini, P. Simoni, M. Barbieri, M. Marini, F. Bersani (1973): Ultrastructural investigation of the effect of DNA, RNA and protein synthesis inhibitors in ribosome crystallisation.
J. Ultrastruct. Res. 44, 265-279

- Martinez-Palamo, A., C. Brailovsky (1968): Surface layer in tumor cells transformed by Adeno-12 and SV 40 viruses.
Virology 34, 379-382
- Martinez-Palamo, A. (1970): The surface coat of animal cells.
Int. Rev. Cytol. 29, 29-75
- Moore, D.H., M.C. Davies, S. Levine, M.E. Englert (1962): Correlation of structure with infectivity of influenza virus.
Virology 17, 470-479
- Morgan, C., C.K. Hsu, R.A. Rifkind, A.W. Knox, H.M. Rose (1961 a): The application of ferritin-conjugated antibody to electron microscopic studies of influenza virus in infected cells.
I. The cellular surface.
J. exp. Med. 114, 825-831
- Morgan, C., C.K. Hsu, R.A. Rifkind, A.S. Knox, H.M. Rose (1961 b): The application of ferritin-conjugated antibody to electron microscopic studies of influenza virus in infected cells.
II. The interior of the cell.
J. exp. Med. 114, 833-836
- Morgan, C., C.K. Hsu, H.M. Rose (1962): Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. VII. Incomplete influenza virus.
J. exp. Med. 116, 553-564
- Morgan, C., H.M. Rose (1968): Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. VIII. Entry of influenza virus.
J. Virol. 2, 925-936

- Morgan, H.R. (1968): Ultrastructure of the surfaces of cells infected with avian leukosis-sarcoma viruses.
J. Virol. 2, 1133-1146
- Nayak, D.P. (1972): Defective virus RNA synthesis and production of incomplete influenza virus in chick embryo cells.
J. gen. Virol. 14, 63-67
- Nermut, M.V. (1972): Further investigations on the fine structure of influenza virus.
J. gen. Virol. 17, 317-331
- Perdue, J.F. (1973): The distribution, ultrastructure, and chemistry of microfilaments in cultured chick embryo fibroblasts.
J. Cell Biol. 58, 265-284
- Pereira, H.G., A. Gompels (1954): The growth of fowl plague and Newcastle disease virus in roller-tube cultures.
J. Path. Bact. 67, 109-115
- Pfeifer, U. (1973): Morphologische und funktionelle Aspekte der cellulären Autophagie.
Acta Morph. Acad. Scient. Hungaricae 20, 247-269
- Rott, R., H. Becht, H.-D. Klenk, C. Scholtissek (1972): Interactions of Concanavalin A with the membrane of influenza virus infected cells and with envelope components of the virus particle.
Z. Naturforsch. 27 b, 227-233

- Rott, R., H. Becht, G. Hammer, H.-D. Klenk,
C. Scholtissek (1974): Changes of the
surface of the host cell after infection
with enveloped viruses. In: R.D. Barry und
B.W.J. Mahy: Negative strand viruses
(im Druck)
Academic Press, London-New York
- Saito, Y., I. Yoshioka, Y. Igarashi, S. Nakagaura (1970):
Nuclear inclusions observed by electron
microscope in cynomolgus monkey kidney cells
infected with influenza virus.
Virology 40, 408-409
- Schäfer, W., W. Zillig, K. Munk (1954): Isolierung und
Charakterisierung hämagglutinierender nicht-
infektiöser Einheiten bei klassischer Geflügel-
pest.
Z. Naturforsch. 9 b, 329-340
- Small, J.V., H.G. Davies (1972): Erythropoiesis in the
yolk sac of the early chick embryo: An
electron microscope and microspectrophotometric
study.
Tissue and Cell 4, 341-378
- Sterz, I. (1972): Elektronenmikroskopische und virolo-
gische Untersuchungen an Hühnerthrombozyten
nach Infektion mit dem Virus der Klassischen
Geflügelpest (KP) in vitro und in vivo.
Vet. Dissertation Gießen
- Stockinger, L. (1969): Zwischenzellverbindungen und
Kontakte.
Münch. Med. Wochenschr. 111, 1458-1484

- Venable, J.H., R. Coggeshall (1965): A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 25, 407-408
- Waterson, A.P., R. Rott, W. Schäfer (1961): The structure of fowl plague virus and virus N. Z. Naturforsch. 16 b, 154-156
- White, D.O. (1974): Influenza viral proteins: Identification and synthesis. Curr. Topics Microbiol. Immunol. 63, 1-48
- Yardley, J.H., M.W. Heaton, L.M. Gaines, L.E. Shulman (1960): Collagen formation by fibroblasts. Bull. Johns Hopkins Hosp. 106, 381-393
- Yardley, J.H., G.D. Brown (1965): Fibroblasts in tissue culture. Use of colloidal iron for ultra-structure localisation of acid mucopolysaccharides. Lab. Invest. 14, 501-513

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

In erster Linie gilt mein Dank Herrn Prof. Dr.E. Weiss für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung dieser Aufgabe.

Weiterhin Herrn Prof. Dr. R. Rott, der mir inhaltliche Anregungen gab und Einrichtungen und Mitarbeiter seines Institutes zur Verfügung stellte. In diesem Zusammenhang möchte ich den Mitarbeitern des Gewebekulturlabors des Virologischen Institutes der Justus Liebig-Universität Gießen und Fräulein M.Orlich meinen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. K. Frese und Herrn Prof.Dr. H. Krauss bin ich für die theoretischen und praktischen Hinweise zu Dank verpflichtet. Frau Dr. I. Sterz danke ich für die Einführung in die Materie und die Beratung bei der Durchführung der Arbeit.

Fräulein D. Hildebrand und Frau G. Erhardt habe ich für die Hilfe bei der Herstellung der Dünnschnitte und Frau U. Zeller für die fotografischen Arbeiten zu danken.

LEBENS LAUF

Am 21. Juni 1949 wurde ich, Manfred Reinacher, als Sohn des Chemikers Dr. G. Reinacher und seiner Ehefrau Paula geb. Klein in Gelnhausen geboren.

Von 1955 bis 1959 besuchte ich die Bezirksschule III in Hanau und anschließend die dortige Hohe Landesschule, an der ich im Juni 1967 das Abitur im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig bestand.

Vom Wintersemester 1967/68 an studierte ich an der Justus Liebig-Universität Gießen Veterinärmedizin. Die Tierärztliche Vorprüfung bestand ich im Sommer 1969 und die Tierärztliche Prüfung im Winter 1972. Die Approbation als Tierarzt erhielt ich im Dezember 1972.

Mit der vorliegenden Dissertation bin ich seit Januar 1973 beschäftigt. Von Januar 1973 bis Mai 1973 erhielt ich ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz. Seit Juni 1973 bin ich als wissenschaftlicher Bediensteter am Veterinär-Pathologischen Institut der Justus Liebig-Universität Gießen angestellt.

